

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Inneren Klinik (Tumorforschung)

**Expression und Amplifikation von HER2 und Marker der Signalwegaktivierung beim
fortgeschrittenen oder metastasierten Adenokarzinom der Lunge**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Ulrich Cyril Huber

aus Köln

2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Schuler

2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. C. Aigner

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2017

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingeflossen:

Reis, H., Herold, T., Ting, S., Worm, K., Huber, U., Christoph, D., Eberhardt, W., Kostbade, K., Kasper, S., Stamatidis, G., Darwiche, K., Karpf-Wissel, R., Theegarten, D., Schmid, K., Schuler, M., Wiesweg, M. (2015):

HER2 expression and markers of phosphatidylinositol-3-kinase pathway activation define a favorable subgroup of metastatic pulmonary adenocarcinomas.

Lung Cancer 88(1), 34 – 41.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1 Epidemiologie.....	6
1.2 Stadieneinteilung	7
1.3 Molekularpathologie des Adenokarzinoms der Lunge.....	10
2. Material und Methoden	19
2.1 Patientenkollektiv.....	19
2.2 Datenerhebung.....	19
2.3 Statistik.....	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Charakterisierung der Patientenkohorte	22
3.2 Immunhistochemie	24
3.3 Korrelationsanalyse	28
3.4 Überlebensanalysen.....	31
4. Diskussion.....	35
4.1 Epidemiologische Auswertung.....	35
4.2 HER2-Überexpression, -Amplifikation, -Mutation	35
4.3 Prognostische Bedeutung von HER2 bzw. pAKT zu OS und TTF im Stadium IV...	36
4.4 Zusammenhang von HER2 und pAKT	38
5. Zusammenfassung	40
6. Literaturverzeichnis	41
7. Anhang	51
7.1 Tabellenverzeichnis.....	51
7.2 Abbildungsverzeichnis	51
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	52
7.4 Danksagung	53
7.5 Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom gehört zu den häufigsten Krebsarten und stellt in Deutschland unter allen Krebsentitäten mit 24,8% die führende Todesursache bei Männern respektive mit 14,6% die zweithäufigste Todesursache bei Frauen dar. So kam es laut Kaatsch und al. in der Bundesrepublik im Jahr 2012 zu 34.490 Neuerkrankungen unter Männern und 18.030 Neuerkrankungen unter Frauen, sowie 29.713 männlichen und 14.752 weiblichen Todesfällen (Kaatsch et al. 2015). Dem Epidemiologischen Krebsregister NRW zufolge lag 2013 unter den Frauen der Anteil der Lungenkrebs bedingten Todesfälle mit 17,2 % nahezu gleichauf mit denen der Sterbefälle aufgrund von Brustkrebs mit 17,6% (Heidinger et al. 2015)

Lungenkarzinome gehören zu den prognostisch ungünstigsten Neoplasien. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate betrug im Zeitraum 2009-2010 16% bei Männern und 21% bei Frauen.

Die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten entwickeln sich zwischen beiden Geschlechtern unterschiedlich. Während diese bei den Frauen seit Ende der 1990er Jahre um ca. 30% gestiegen sind, nahmen sie bei den Männern im gleichen Zeitraum um 20% ab (Kaatsch et al. 2015).

Nach histologischen und klinischen Kriterien wurden Lungenkarzinome historisch in zwei Hauptgruppen unterteilt: die kleinzelligen Lungenkarzinome (small cell lung cancer, SCLC) und die Gruppe der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (non-small cell lung cancer, NSCLC).

Ungefähr 85% aller Fälle werden vom NSCLC ausgemacht. Zu dieser Gruppe zählen das Adenokarzinom, das Plattenepithelkarzinom, das großzellige Karzinom sowie eine Reihe seltener Karzinomtypen, wobei das Adenokarzinom global mit 80% den größten Anteil trägt und eine zunehmende Inzidenz aufweist (Zhao et al. 2014). Auch in Deutschland sind Adenokarzinome mittlerweile deutlich häufiger als Plattenepithelkarzinome und SCLC.

Trotz Fortschritten in der Früherkennung werden NSCLC nach wie vor häufig erst in einem fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium diagnostiziert mit daraus resultierender schlechter Prognose (Herbst et al. 2008).

1.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des NSCLC erfolgt nach dem TNM-System und dient der Einteilung in vier prognosebestimmende Gruppen (s. Tabelle 1-4). Die in dieser Arbeit untersuchten Tumoren wurden gemäß der zu dem Zeitpunkt gültigen 7. Fassung der Tumorstadien nach UICC (Union internationale contre le cancer) eingeteilt (Wittekind und Bertolini 2010), wobei diese am 01.01.2017 durch die aktuelle 8. Fassung abgelöst wurde (Goldstraw et al. 2016).

Das in dieser Untersuchung relevante Kollektiv setzt sich aus Patienten mit Adenokarzinom der Lunge in den Stadien III und IV zusammen.

Das Stadium III wird als lokal fortgeschrittenes Stadium bezeichnet, in dem ein relativ großer Primärtumor sowie im Regelfall bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen. Fernmetastasen dürfen nicht vorhanden sein. Das Stadium III kann nochmals in Stadium IIIA bzw. IIIB unterteilt werden.

Für die Einstufung in das Stadium IIIA muss ein Tumor (T1 – T3) bereits mediastinale Lymphknotenmetastasen gebildet haben (N2) bzw. darf ein weit fortgeschrittener Tumor (T4) maximal frühe Lymphknotenstationen (N1) besiedelt haben.

Das Stadium IIIB zeichnet sich durch einen großen oder lokal infiltrierenden oder ipsilateral pulmonal metastasierten Primärtumor (T4) bei Metastasierung in die ipsilateralen mediastinalen Lymphknotenstationen aus (N2) bzw. einen beliebig großen Tumor mit kontralateraler mediastinaler oder distanter Lymphknotenbesiedelung (N3) aus.

Der Anteil des Stadiums III unter den Primärdiagnosen liegt bei etwa 25%.

Die Klassifikation in das Stadium IV erfolgt beim Nachweis von Fernmetastasen. Man differenziert in der 7. Auflage der Stadieneinteilung zwischen ausschließlicher Metastasierung in die Pleura oder die kontralaterale Lunge (M1a) oder extrapulmonaler Metastasierung (M1b). Aktuell werden ca. 40 % aller Patienten erst im Stadium IV neu diagnostiziert (Morgensztern et al. 2010).

Tabelle 1: T-Stadium des NSCLC nach UICC/IALSC 7. Auflage, gültig bis 31.12.2016
(Wittekind und Bertolini 2010)

Tis	- Carcinoma in situ
T1	- Größter Durchmesser <3cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt
- T1a	- <2 cm
- T1b	- >2 < 3 cm
T2	- Größter Durchmesser 3 - 7 cm oder - Infiltration des Hauptbronchus oder - Infiltration der viszeralen Pleura oder - tumorbedingte partielle Atelektase
- T2a	- 3 - 5 cm
- T2b	- 5 - 7 cm
T3	- Größter Durchmesser > 7 cm oder - Infiltration von Zwerchfell, N. phrenicus, mediastinaler Pleura oder parietalem Perikard - Tumor im Hauptbronchus < 2 cm distal der Karina, aber ohne Beteiligung der Karina - Tumor-assoziierte komplette Atelektase oder obstruktive Pneumonie - zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen
T4	- Tumor jeder Größe mit Infiltration von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Karina - Zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen

Tabelle 2: N-Stadium des NSCLC nach UICC/IALSC 7. Auflage, gültig bis 31.12.2016
(Wittekind und Bertolini 2010)

N0	- Keine Lymphknotenmetastasen
N1	- Metastase in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder intrapulmonalen Lymphknoten
N2	- Metastase in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	- Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateralen tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten

Tabelle 3: M-Stadium des NSCLC nach UICC/IALSC 7. Auflage, gültig bis 31.12.2016
(Wittekind und Bertolini 2010)

M0	- Keine Metastasen
M1	- Fernmetastasen
- M1a	- Separater Tumor in einem kontralateralen Lungenlappen - Pleura mit knotigem Befall - Maligner Pleuraerguss - Maligner Perikarderguss
- M1b	- Fernmetastasen

Tabelle 4: Stadieneinteilung des NSCLC nach UICC/IALSC 7. Auflage, gültig bis 31.12.2016 (Wittekind und Bertolini 2010)

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
IA	T1a/b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T1a/b	N1	M0
	T2a	N1	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a/b	N2	M0
	T2a/b	N2	M0
	T3	N1/2	M0
	T4	N0/1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	Jedes T	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

1.3 Molekularpathologie des Adenokarzinoms der Lunge

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen wurde in den letzten Jahren intensiv die Molekularpathologie des NSCLC erforscht. Auf diesem Feld konnten dabei wichtige Erkenntnisse über die molekulare Signalübertragung der Tumorzellen gewonnen werden. Eine Schlüsselrolle nehmen dabei der MAPK (Mitogen-activated protein kinase)- und der PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)/ AKT (Proteinkinase B)/ mTOR (mechanistic target of rapamycin)-Signalweg ein. Zentrale membranständige Rezeptoren gehören zur ERBB-Rezeptorfamilie.

1.3.1 ERBB-Rezeptorfamilie und ihre Biologie

Die ERBB-Familie besteht aus vier verschiedenen membranständigen Enzymen: ERBB1 (HER1, EGFR), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) und ERBB4 (HER4).

Bei den Vertretern dieser Gruppe handelt es sich um sogenannte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) (Moasser 2007).

RTKs sind transmembranäre Proteine, bestehend aus drei unterschiedlichen Domänen:

- einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle,
- einer transmembranären Region sowie
- einer intrazellulären Tyrosinkinase

Die Bindung eines Liganden extrazellulär - ausgenommen ist der HER2-Rezeptor, der keinen bekannten Liganden binden kann - führt zur Homodimerisierung zweier gleicher bzw. zur Heterodimerisierung zweier unterschiedlicher Rezeptoren der ERBB-Familie und konsekutiver Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne, wodurch diese in den aktiven Zustand versetzt wird.

Die Aktivierung von EGFR kann mehrere Wege der intrazellulären Signalübertragung induzieren, die letztlich in zellulären Reaktionen wie Proliferation, Überleben bzw. Invasion, Metastasierung und Angiogenese resultieren (Reungwetwattana und Dy 2013).

Die zwei Hauptwege dieser Signalkette führen einerseits über einen MAP-Kinase-Weg andererseits über die PI3K/AKT/ mTOR-Kaskade (Jorissen et al. 2003).

1.3.1.1 Der MAPK-Signalweg

Nach Autophosphorylierung von Homo- oder Heterodimeren von Rezeptor-Tyrosinkinasen der ERBB-Familie kann Growth factor receptor bound protein 2 (GRB2) an deren intrazelluläre Domäne binden, an welches nun der GTP-Austauschfaktor Son of Sevenless (SOS) bindet.

Das so aktivierte SOS interagiert mit den membrangebundenen GTPasen der RAS-Familie (KRAS, NRAS, HRAS). Beim Lungenkarzinom liegt das Hauptaugenmerk auf KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). Durch Austausch eines GDP durch ein GTP wird das RAS-Protein in den aktiven Zustand versetzt (Cataldo et al. 2011). Dies stößt wiederum eine intrazelluläre Kaskade von Signalproteinen an, die durch spezifische Phosphorylierungen aktiviert werden. Ein wichtiges von KRAS aktiviertes Protein sind die Kinasen der RAF-Familien (ARAF, BRAF, CRAF). Diese können so per Phosphorylierung MEK 1 und 2 (MAPK/ERK Kinase 1 und 2) aktivieren, welche wiederum ERK 1 und 2 (Extracellular-signal Regulated Kinase) aktivieren. Als pERK (phosphorylated ERK) bezeichnet man diese in ihrer aktiven Form.

Dies führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die in den Zellkern translozieren und dort zur Expression proliferationsstimulierender Gene führen (Stinchcombe und Johnson 2014)

1.3.1.2 Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Am Anfang dieses Signalwegs steht die zytosolische PI3K. Das autophosphorylierte ERBB-Dimer kann PI3K sowohl direkt als auch indirekt über das Protein Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS-1) aktivieren.

Aktiviertes PI3K ist in der Lage, membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) zu phosphorylieren.

PIP₃ dient nun als Bindungsstelle für die Proteinkinase B (PKB, AKT), die dort von der Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (PDK1) zweifach phosphoryliert und damit aktiviert wird (Faivre et al. 2006). Phosphoryliertes AKT wird auch als pAKT bezeichnet.

Aktives AKT kann den Zweiprotein-Komplex TSC 1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2) phosphorylieren. Dieser Komplex besteht aus den zwei Proteinen Hamartin (TSC 1) und Tuberin (TSC 2) und verliert durch Phosphorylierung seine hemmende Wirkung auf die Kinase mTOR. Das mTOR-Protein ist dadurch in der Lage, über seine Effektorproteine wie S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) Proteinsynthese und Zellwachstum zu

stimulieren (Yang und Guan 2007).

Im Folgenden werden weitere Bestandteile der ERBB-abhängigen Signaltransduktion beschrieben. Gegen mehrere davon konnten bereits spezifische Hemmstoffe entwickelt werden, die sich teilweise in klinischer Anwendung befinden.

1.3.2 Bereits bekannte molekulare Zielstrukturen beim NSCLC

1.3.2.1 EGFR

2004 entdeckte man den Zusammenhang verschiedener somatischer Mutationen innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne des *EGFR* und dem signifikanten Ansprechen von Lungenkarzinomen auf eine Therapie mit dem reversiblen ATP-kompetitiven EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib (Lynch et al. 2004).

Diese *EGFR*-Mutationen führen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung dieser Tyrosinkinase (Gazdar, A, 2009).

War bei unselektierten Patienten unter Therapie mit Substanzen wie Gefitinib nur eine geringe Wirksamkeit nachweisbar, konnte nun ein anhand des Nachweises bestimmter *EGFR*-Mutationen ausgewähltes Patientenkollektiv der hochwirksamen Therapie mit EGFR-Inhibitoren zugeführt werden (Reungwetwattana und Dy 2013). Neben Gefitinib zeigten sich die verwandte Substanz Erlotinib sowie der irreversible EGFR/HER2/HER4-Inhibitor Afatinib bei Patienten mit *EGFR*-mutiertem NSCLC der Standardbehandlung mit Chemotherapie überlegen. Daher ist heute die Untersuchung auf *EGFR*-Mutationen vor Einleitung der Behandlung von Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge im Stadium IV obligat (Schuler et al. 2015).

1.3.2.2 KRAS

Mit 15-36% ist die Mutation des *KRAS*-Gens (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) die häufigste Alteration beim Adenokarzinom (Marchetti A et al 2009).

Das RAS-Protein nimmt eine wichtige Position ein, da es neben der MAPK-Kaskade auch am PI3K/AKT/mTOR-Signalweg beteiligt ist, indem es die PI3K aktivieren kann.

Ein positiver Mutationsstatus von *KRAS* hat eine fehlende Wirksamkeit von EGFR-TKIs

zur Folge, was durch die Aktivierung der Signalkaskade unterhalb von EGFR zu erklären ist. Trotz großer Mühen in den letzten Jahren gibt es bis jetzt keine zielgerichtete Therapie bei *KRAS*-Mutation (Pao et al. 2005, Zhu et al. 2008).

1.3.2.3 BRAF

BRAF ist Teil des MAPK-Signalwegs unterhalb von RAS.

Eine Mutation des entsprechenden Gens, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 600 führt, resultiert in einem konstitutiv aktiven RAF-Komplex. Bei NSCLC werden solche Mutationen v.a. bei Adenokarzinomen gefunden, ihre Prävalenz wird mit etwa 3% angegeben (Yoon et al. 2010).

Studien haben gezeigt, dass NSCLC-Patienten mit einer V600E-Mutation von einer Therapie mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib, einer Substanz, die gegen das Maligne Melanom entwickelt wurde, profitieren konnten (Hyman et al. 2015).

Planchard et al. konnten zeigen, dass V600E-mutierte NSCLC besser auf eine kombinierte Therapie mit dem BRAF-Inhibitor Dabrafenib und dem MEK-Inhibitor Trametinib ansprechen (Planchard et al. 2016).

1.3.2.4 Das EML4-ALK-Fusionsonkogen

Das EML4-ALK-Fusionsprotein ist Ergebnis eines genetischen Rearrangements zweier Gene: *EML4* (echinoderm microtubule-associated protein-like proteins 4), ein Protein, das an der Struktur und Stabilisierung von Mikrotubuli beteiligt ist, und *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), eines Rezeptors, dessen Tyrosinkinase-Domäne Teil des Fusionsproteins ist und dadurch konstitutiv aktiviert wird. Die Prävalenz dieser Aberration unter den NSCLC wird mit 1-7% angegeben (Soda et al. 2007).

2012 wurde Crizotinib als erste Substanz, die gezielt gegen das Fusionsprotein gerichtet ist, von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zugelassen. Seine Wirksamkeit in der Zweitlinientherapie konnte 2013 bestätigt werden (Shaw et al. 2013). Mittlerweile konnte für das Präparat auch ein Überlebensvorteil in der Behandlung des nicht vorbehandelten ALK1-positiven, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms nachgewiesen und ihm durch die EMA eine Zulassung für diese Indikation erteilt werden (Solomon et al. 2014, EMA 2015).

Der nächste Schritt konnte 2014 mit Ceritinib gemacht werden, welches sich selbst bei Crizotinib-resistenten, ALK-positiven Tumoren als wirkungsvoll erwies (Shaw et al. 2014). Ceritinib wurde von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) und der EMA für Patienten mit Crizotinib-Resistenz zugelassen. Weitere Substanzen (Alectinib, Brigatinib, Lorlatinib) befinden sich in klinischer Entwicklung.

1.3.2.5 Das ROS1-Rearrangement

ROS1 (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase 1) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase mit hoher Ähnlichkeit zu ALK und kann mittels Phosphorylierung RAS aktivieren. Chromosomale Rearrangements des *ROS1*-Gens mit anderen Genen und der damit verbundenen Entstehung eines Fusionsproteins führen zur konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne von ROS1 (Rikova et al. 2007).

Die Prävalenz entsprechender Rearrangements wird in der Literatur mit 1-2% aller NSCLCs angegeben. Häufig sind sie bei Patienten asiatischer Rasse bzw. jüngeren Alters zu finden sowie bei Nie-Rauchern.

Studien belegen, dass auch Patienten mit einer *ROS1*-Translokation von einer Therapie mit Crizotinib profitieren (Shaw et al. 2014, Mazières et al. 2015), sodass Crizotinib mittlerweile durch die FDA und die EMA für die Erstlinienbehandlung von Patienten mit *ROS1*-positivem, metastasiertem NSCLC zugelassen ist.

1.3.3 HER2 als Ansatz für zielgerichtete Therapien

HER2 ist unter den Mitgliedern der HER-Familie der einzige Vertreter, für den kein Ligand bekannt ist. Jedoch stellt es für die restlichen Mitglieder den bevorzugten Partner zur Heterodimerisierung und damit zur Aktivierung der Signalkaskade dar (Graus-Porta et al. 1997).

1993 konnte zum ersten Mal ein humanisierter, monoklonaler, gegen HER2 gerichteter Antikörper hergestellt werden (Lewis et al. 1993), der 1998 als Trastuzumab (Herceptin) die Marktzulassung durch FDA erhielt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper bei Patientinnen mit Brustkrebs mit positivem HER2-Status zu einem signifikant höheren Gesamtüberleben (overall survival, OS) führt. Der genaue Mechanismus des antiproliferativen Effekts von Trastuzumab auf HER2 ist bis dato noch nicht vollständig geklärt.

Diskutiert werden verschiedene Ansätze, wobei die Tatsache, dass Trastuzumab HER2-exprimierende Zellen markiert und den Immunzellen zur Apoptose darbietet, zumindest erheblichen Anteil zu diesem Effekt beiträgt (Clynes et al 2000).

Trastuzumab wurde 1998 von der FDA in den USA bzw. 2000 von der EMA zur Behandlung von HER2-positiven Brustkrebspatientinnen zugelassen.

HER2-Positivität ist allgemein definiert als eine verstärkte Expression des HER2-Moleküls respektive eine erhöhte Anzahl an *HER2*-Genkopien. Für die Analyse des HER2-Status stehen zwei Verfahren zur Verfügung, mit denen sich diese beiden Parameter bestimmen lassen:

1. Die immunhistochemische Methode arbeitet mit dem HercepTest® der Firma DAKO und erlaubt eine semiquantitative Messung der HER2-Molekül-Expression.

Es handelt sich hierbei um einen zweistufigen Test. In einem ersten Schritt wird die zu untersuchende Gewebeprobe mit primären gegen HER2-gerichteten Kaninchen-Antikörpern inkubiert. Im zweiten Schritt werden sekundäre Anti-Kaninchen-Immunglobuline aus Ziegen serum sowie Meerrettichperoxidase-moleküle hinzugegeben. Diese Peroxidase lagert sich an den sekundären Antikörpern an und katalysiert die Umwandlung eines anschließend zugegebenen Chromogens zum sichtbaren Reaktionsprodukt.

Der HER2-Score wird beim Mammakarzinom nach folgenden Kriterien ermittelt. Für andere Tumore (insbesondere Magenkarzinom) gelten separate Kriterien

DAKO HercepTest®	Reaktionsmuster	Bewertung
0	Keine Färbereaktion oder <10% der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran	Negativ
1+	>10% der invasiven Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung der Zellmembran	Negativ
2+	>10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität gering bis mittelgradig	Schwach positiv (geringe HER2-Überexpression)
3+	>10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran, Färbeintensität stark	Stark positiv (starke HER2-Überexpression)

(Dako 2015)

Bei einem DAKO-Score von 0+ bzw. 1+ wird eine Therapie mit Trastuzumab nicht empfohlen. Ein Wert von 2+ wird als schwach positiv bezeichnet. In diesem Fall schließt sich eine weitergehende Analyse mittels FISH (s.u.) an. Ein DAKO-Score von 3+ ist eine eindeutige Indikation für eine Trastuzumab-Therapie.

2. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, mit dem der *HER2*-Status auf Ebene der DNA untersucht wird. Es dient der Identifizierung von Kopien des entsprechenden *ERBB*-Gens, wodurch sich eventuell bestehende Vermehrungen des Gens nachweisen lassen. Ist die Kopienanzahl erhöht, nimmt man an, dass der Tumor *HER2*-abhängig wächst und empfindlich auf Trastuzumab reagieren wird.

Verwendet werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonden, die komplementär zu den Genabschnitten von *HER2* sowie zu Abschnitten von Chromosom 17, das Chromosom, auf dem sich das *ERBB*-Gen befindet, sind und sich dort anlagern. Unter dem Mikroskop kann dann die Anzahl an Genkopien gezählt und mit der Anzahl an Kopien des Centromers 17 ins Verhältnis gesetzt werden, um etwaige Artefakte bei dieser Methode herauszufiltern. Ein Quotient aus *HER2*-Kopienanzahl und Centromer-17-Anzahl von über 2,2 wird als *HER2*-FISH-positiv bezeichnet und ist ebenfalls eine Indikation für eine Therapie mit Trastuzumab (Wolff et al. 2007).

Ein dazu analoges Verfahren stellt die Chromogene-in-situ-Hybridisierung (CISH) dar, bei der die komplementären DNA-Sonden an den Farbstoff Digoxigenin anstelle des Fluoreszenzfarbstoffes gekoppelt sind. Dies ermöglicht die Signalauswertung mittels Lichtmikroskop statt des Fluoreszenzmikroskops und eine insgesamt einfachere Handhabung (Tanner et al. 2000, Sàez et al. 2006). Durchführung und Auswertung dieser Methode entsprechen denen der FISH. Die Analyse des *HER2*-Amplifikationsstatus erfolgte in dieser Arbeit mittels CISH.

Für zwei Tumorentitäten gilt mittlerweile *HER2*-Überexpression als Kriterium für eine Therapie mit Trastuzumab. Diese werden im Folgenden dargelegt.

1.3.4 HER2-Überexpression bei Mamma- und Magenkarzinom

1.3.4.1 Mammakarzinom

Slamon et al. beschrieben 1987 erstmals den Zusammenhang zwischen Amplifikation des *HER2*-Gens (bzw. Überexpression von HER2) und signifikant schlechterem Outcome bei Brustkrebspatientinnen und den Amplifikationsstatus als den wichtigsten prädiktiven Faktor neben einem positiven Lymphknotenstatus.

Bei 25-30% aller Brustkrebspatientinnen tritt eine entsprechende Überexpression auf (Slamon et al. 1987).

Die EMA hat Trastuzumab mittlerweile für die Therapie des Mammakarzinoms sowohl im Frühstadium als auch im metastasierten Stadium in Mono- bzw. Kombinationstherapie zugelassen.

1.3.4.2 Das Magenkarzinom

Yano et al. gaben hinsichtlich des Magenkarzinoms in einer Studie aus dem Jahr 2006 die Prävalenz einer positiven HER-Expression – definiert durch IHC 3+ – mit etwa 17% und die eines positiven Amplifikationsstatus – untersucht mittels FISH – mit 27,1% an (Yano et al. 2006).

In einer darauffolgenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich bei HER2-positivem Magenkarzinom ein Überlebensvorteil durch die Hinzunahme von Trastuzumab zu einer Chemotherapie ergibt (13,8 Monate zu 11,1 Monate) (Bang et al. 2010).

1.3.5 Bisherige HER2-gerichtete Therapieansätze beim NSCLC

Die Häufigkeit einer HER2-Überexpression beim NSCLC wird in der Literatur mit 2% bis 40% angegeben (Slamon et al. 2005).

Eine Amplifikation von *HER2* liegt in etwa 2% aller NSCLC-Patienten vor (Heinmöller et al. 2003). Die Mutation des *HER2*-Gens in Form der In-Frame-Insertion in Exon 20, in einer Studie von Mazières et al. in 1,7% aller Fälle festgestellt (Mazières et al. 2013), konnte beim Lungenkarzinom als bisher einziger Entität beschrieben werden.

Motiviert von den Entwicklungen der Therapie beim Mammakarzinom untersuchte man,

ob sich bei positivem HER2-IHC-Status ein Überlebensvorteil durch Trastuzumab-Monotherapie (Clamon et al. 2005) bzw. als Kombinationstherapie mit Gemcitabin/Cisplatin (Gatzemeier et al. 2004) ergibt. Beide Studien fielen negativ aus, wobei in letzterer ein Trend hin zu einem höheren Ansprechen bei der allerdings sehr kleinen HER2 3+/FISH-positiven Subgruppe zu erkennen war (Gatzemeier et al. 2004).

In jüngeren Studien schien sich eine Sensitivität von *HER2*-mutierten Adenokarzinomen gegenüber Trastuzumab (Mazières et al. 2013) sowie Afatinib (De Grève et al. 2012, Mazières et al. 2013) zu zeigen. Diese Gruppe von Patienten weist eine aktivierende Mutation ähnlich der *EGFR*-Mutation auf und muss daher von der Gruppe mit HER2-Überexpression biologisch und klinisch strikt abgegrenzt werden.

1.3.6 Fragestellung

Trotz umfangreicher Forschung in den letzten Jahren zum NSCLC auf molekularpathologischer Ebene, gibt es zahlreiche Komponenten in den zellulären Transduktionskaskaden, zu denen die Datenlage – insbesondere für Patienten mit fortgeschrittener Krankheit - bis dato gering ist. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet könnten helfen, den molekularen Mechanismus, der die Krankheit unterhält, besser zu verstehen und daraus neue Impulse für die Therapie insbesondere des metastasierten Adenokarzinoms der Lunge zu entwickeln.

In diesem Sinne beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Rezeptor-Tyrosinkinase HER2 und seinem Zusammenspiel zwei wichtigen intrazellulären Signalübertragungswegen: Dem MAPK-Signalweg und dem PI3K/pAKT/mTOR-Signalweg. In beiden Signalwegen führt die Phosphorylierung von Signalproteinen zur Änderung ihres Aktivierungsstatus. Daher wurde für diese Untersuchung der Nachweis der Phosphorylierung von ERK an Threonin 202 bzw. Tyrosin 204 und von AKT an Serin 473 als Biomarker für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs bzw. des PI3K/pAKT/mTOR-Signalwegs verwendet. Das immunhistochemisch ermittelte Ausmaß der Phosphorylierung wurde auf eine Assoziation zum klinischen Verlauf der Patienten sowie auf einen Zusammenhang mit Veränderungen von HER2 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In die Untersuchung wurden 193 Patienten eingeschlossen, die sich aufgrund eines Adenokarzinoms der Lunge in der Inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen in Behandlung befanden. Alle Patienten hatten der molekularpathologischen Untersuchung ihres Tumors aus diagnostischen Gründen zugestimmt.

Kriterien für einen Einschluss waren folgende:

- Vorliegen eines Adenokarzinoms der Lunge im Stadium III bzw. im Stadium IV
- Behandlung der Erkrankung am Universitätsklinikum Essen

Einschlusszeitraum war von 01.01.2012 bis zum 01.07.2013.

2.2 Datenerhebung

Die Untersuchung bestand aus zwei Teilen, einerseits der Auswertung der klinischen Verläufe der Patienten, andererseits der Analyse der immunhistochemischen bzw. molekulargenetischen Eigenschaften der Tumoren.

1. Bei der Dokumentation der klinischen Verläufe wurden folgende Daten erfasst:

- Zeitpunkt und diagnostisches Mittel der Erstdiagnose.
- Beginn, Dauer und Art der Therapiemaßnahmen:
bei chirurgischem Therapieansatz der Tag der Operation, bei Radiotherapie erster und letzter Tag sowie Zielgebiet, Fraktionierung und Gesamtdosis der Bestrahlung, bei Chemotherapie deren erster und letzter Tag sowie eingesetzte Substanzen mit jeweiliger Dosierung.

Die Therapiemaßnahmen entsprachen den Empfehlungen des Tumorboards des Lungenkrebszentrums des Westdeutschen Tumorzentrums anhand aktuell gültiger Leitlinien, des verfügbaren medizinischen Wissens oder im Rahmen wissenschaftlich kontrollierter klinischer Studien.

- Tumorentwicklung im Rahmen von Staging-Untersuchungen während der Therapie. Diese Evaluierung wurde angelehnt an RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) vorgenommen (Eisenhauer et al. 2009).
- Krankheitsentwicklung im Rahmen von Kontrolluntersuchungen nach Beendigung der Therapie bzw. durch neu aufgetretene klinische Symptomatik.
- Patientenstatus zum Endpunkt der Untersuchung: In Therapie, ohne Therapie, Kontakt abgebrochen, Patient verstorben.

Folgende Quellen wurden hierfür herangezogen:

- Digitalisierte Arztbriefe in der Datenbank des Universitätsklinikums Essen,
- Verlaufsdocumentation ambulanter Aufenthalte am Universitätsklinikum Essen,
- CATO, die Computeranwendung für die Planung von Chemotherapien am Universitätsklinikum Essen und
- Centricity, das Bildarchivierungs- und Kommunikationssystem für bildgebende Befunde des Universitätsklinikums Essen.

Die gesammelten Daten wurden in einem Computerprogramm, das speziell für diesen Zweck von Dr. med. Marcel Wiesweg, Klinik für Innere Medizin (Tumorforschung) am Universitätsklinikum Essen, entwickelt wurde, zusammengetragen und ausgewertet. Auf diese Weise konnten das Gesamtüberleben sowie der Zeitraum bis zum Versagen der Ersttherapie (time to treatment failure, TTF) ermittelt werden.

2. Die Untersuchungen der biologischen Eigenschaften der Tumoren wurden allesamt am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen an Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben (FFPE) vorgenommen.

Der immunhistochemische HER2-Status wurde im Zeitraum vom 1. Januar 2012 bis zum 30. November 2012 mittels HercepTest der Firma Dako und ab dem 1. Dezember 2012 mittels PATHWAY anti-HER2 in Kombination mit Benchmark Ultra System der Firma Ventana Medical Systems analysiert (s. Absatz 1.3.3.).

Die Analyse der Phosphomarker pAKT und pERK wurde mittels Immunhistochemie durchgeführt. Die entsprechenden Antikörper waren folgende:

- pAKT^{S473} (#sc-7985, 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) und
- pERK (phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (20G11), #4376, 1:100; Cell Signaling Technology, Cambridge, UK).

Für die Auswertung kam ein modifizierter Punkte-Score zur Anwendung, mit dem die Expression der jeweiligen Phosphomarker ermittelt wurde. Dieser Score lässt sich aus dem Produkt der Punkte für den Anteil der angefärbten Tumorzellen (0 Punkte: 0%, 1 Punkt: 1-10%, 2 Punkte: 11-50%, 3 Punkte: 51-100%) sowie der Punkte für die Intensität der Färbung (0 Punkte: negativ, 1 Punkt: schwach, 2 Punkte: moderat, 3 Punkte: stark) ermitteln. Demzufolge reichte das Punktespektrum von 0 bis 9, wobei 9 Punkte die maximal mögliche Expression der Rezeptoren darstellten.

Jeder Punktwert ≥ 1 wurde als Positivität des entsprechenden Rezeptors gedeutet.

Der Amplifikationsstatus von *HER2* wurde mittels Chromogene-in-situ-Hybridisierung (CISH) untersucht. Dafür kam das Präparierset ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN17 Probe Kit (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) zum Einsatz. Dieser Untersuchung zugeführt wurden alle Proben, die einen immunhistochemisch nachgewiesenen HER2-Expressionsgrad sowohl von 2+ als auch von 3+ zeigten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt analog zu der Methode mittels FISH und ist in Abs. 1.3.3 näher beschrieben.

Die DNA-Sequenzierung der einzelnen Proben wurde mittels der Methode nach Sanger mit einem 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland, ehemals Life Technologies) durchgeführt.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS Statistics (19. Version, IBM, Armonk, USA).

Korrelationen wurden je nach vorliegendem Skalenniveau mittels Pearson-Korrelationskoeffizient bzw. Spearman-Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Für die Analyse von Gesamtüberleben und time to treatment failure kam die Methode nach Kaplan und Meier (Kaplan und Meier 1985) zur Anwendung. Als statistischer Test zur Prüfung der Gleichheit der Überlebenskurven wurde der Log-Rang-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau (α , Fehler 1. Art) betrug 5%.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Von den 193 eingeschlossenen Patienten waren 107 männlich (55,6%) und 86 weiblich (44,6%).

Der Altersdurchschnitt aller Patienten bei Erstdiagnose lag bei 60,3 Jahren (geringstes Alter: 34 Jahre, höchstes Alter: 83 Jahre).

51 Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Stadium III und 142 (73,6%) bereits im Stadium IV.

Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung betrug 679 Tage bei einem Standardfehler von 78 Tagen. Aufgetrennt nach Stadium, ergab sich im Stadium III eine mittlere Überlebenszeit von 1031 ± 282 Tagen und im Stadium IV von 657 ± 107 Tagen (s. Abbildung 1).

Hinsichtlich der 1-Jahresüberlebensrate ergaben sich für das Stadium III ein Wert von 90,7 % respektive ein Wert von 64,5 % im Stadium IV. Die 2-Jahresüberlebensrate betrug im Stadium III 56,5 % und im Stadium IV 42,9 %.

Die mediane Dauer bis zum Therapieversagen in der Erstlinientherapie (TTF) betrug 303 Tage bei einem Standardfehler von 25 Tagen (s. Abbildung 2).

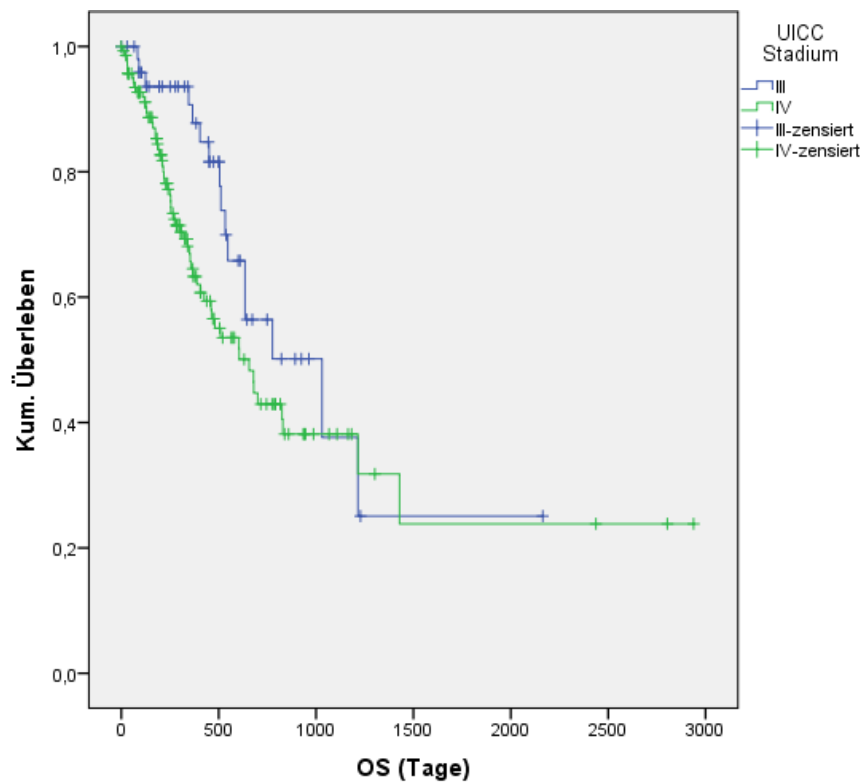


Abbildung 1: Gesamtüberleben ST. III und ST. IV

Mediane Überlebenszeit (OS): Stadium III = 1031 Tage (d), Stadium IV = 657 d ($p = 0,077$)

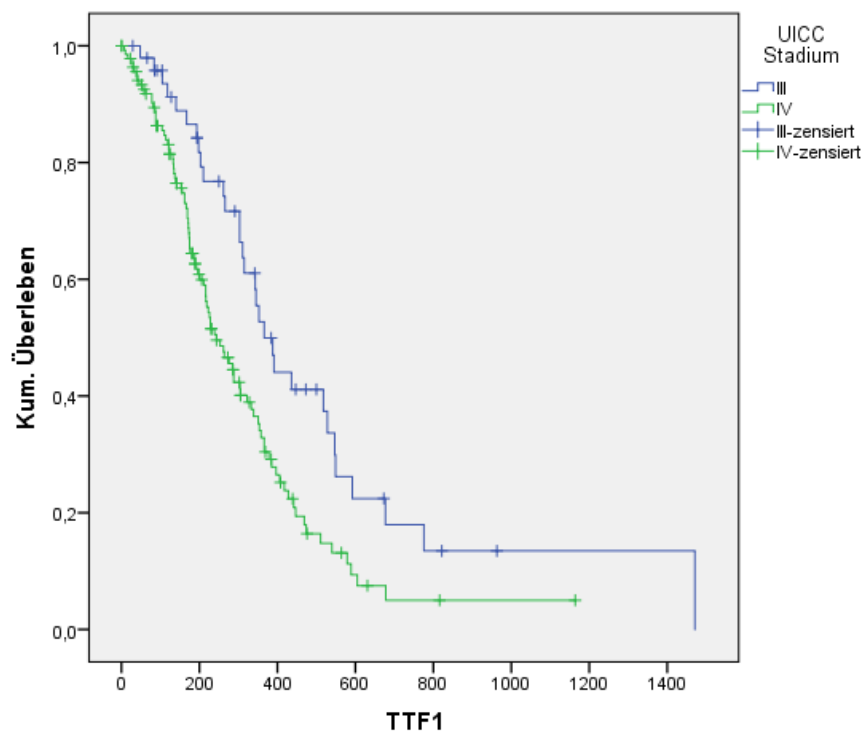


Abbildung 2: Time to Treatment Failure (TTF) ST. III und ST. IV

Mediane TTF: Stadium III = 366 d, Stadium IV = 244 d ($p=0,03$)

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 HER2-Status

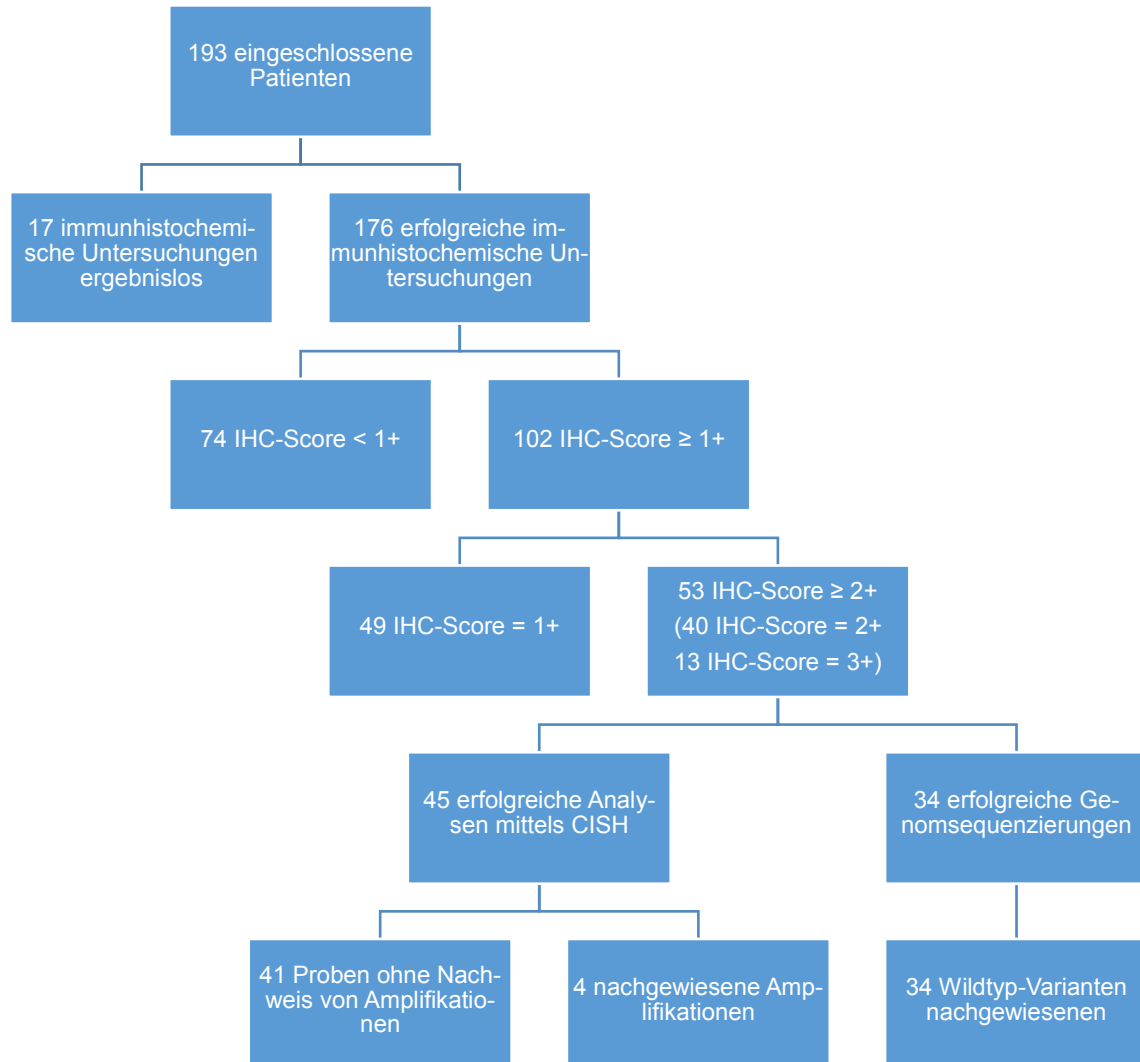


Abbildung 3: Diagramm des Untersuchungs-Algorithmus auf HER2-Expression, Amplifikations- und Mutationsstatus

In 176 von 193 Fällen konnte die immunhistochemische Untersuchung des HER2-Status erfolgreich durchgeführt werden. In 102 Fällen konnte HER2-Positivität – definiert als DAKO-Score ≥ 1 – festgestellt werden (s. Abbildung 3).

Bei 40 Patienten (22,7%) ergab sich ein IHC-Score von 2+ und bei 13 Patienten (7,4%) ein IHC-Score von 3+. In diesen beiden Gruppen aus insgesamt 53 Patienten wurden anschließend der Amplifikationsstatus und der HER2-Mutationsstatus bestimmt.

Eine CISH konnte in 45 von 53 Fällen (84,9%) erfolgreich durchgeführt, aber nur in 4 Fällen (7,5%) eine Amplifikation nachgewiesen werden.

Der Mutationsstatus konnte in 34 von 53 Fällen erfolgreich erhoben werden, nur Wildtyp-Varianten wurden jedoch gefunden. Die geringere Anzahl erfolgreicher Mutationsanalysen war dadurch bedingt, dass Tumormaterial bzw. isolierte DNA für Sequenzanalysen anderer Marker wie KRAS, EGFR, BRAF und PIK3CA in einer Reihe von Patienten bereits aufgebraucht war.

3.2.2 pAKT-Status

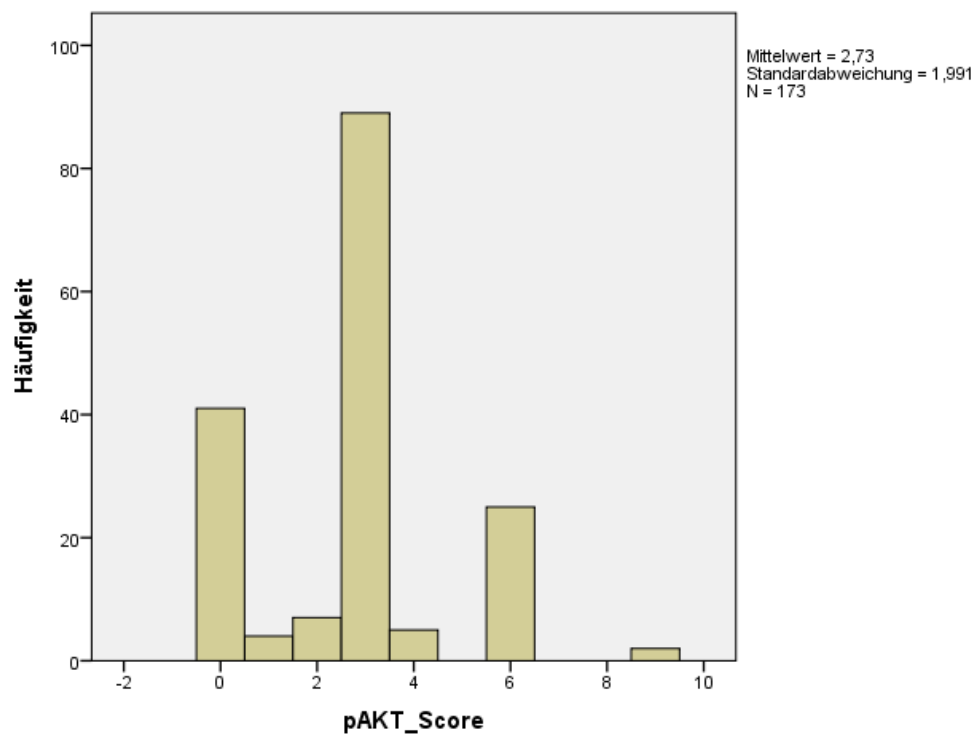


Abbildung 4: Verteilungshistogramm der Medianwerte des pAKT-Scores

Die immunhistochemische Untersuchung des pAKT-Status konnte in insgesamt 173 der 193 Proben (89,6%) erfolgreich durchgeführt werden.

In 132 dieser Fälle (76,3%) konnte eine Positivität von pAKT Sinne eines Punktwertes ≥ 1 festgestellt werden.

Die Verteilung der Proben nach pAKT-Score ist in Abb. 4 als Histogramm dargestellt.

3.2.3 pERK-Status

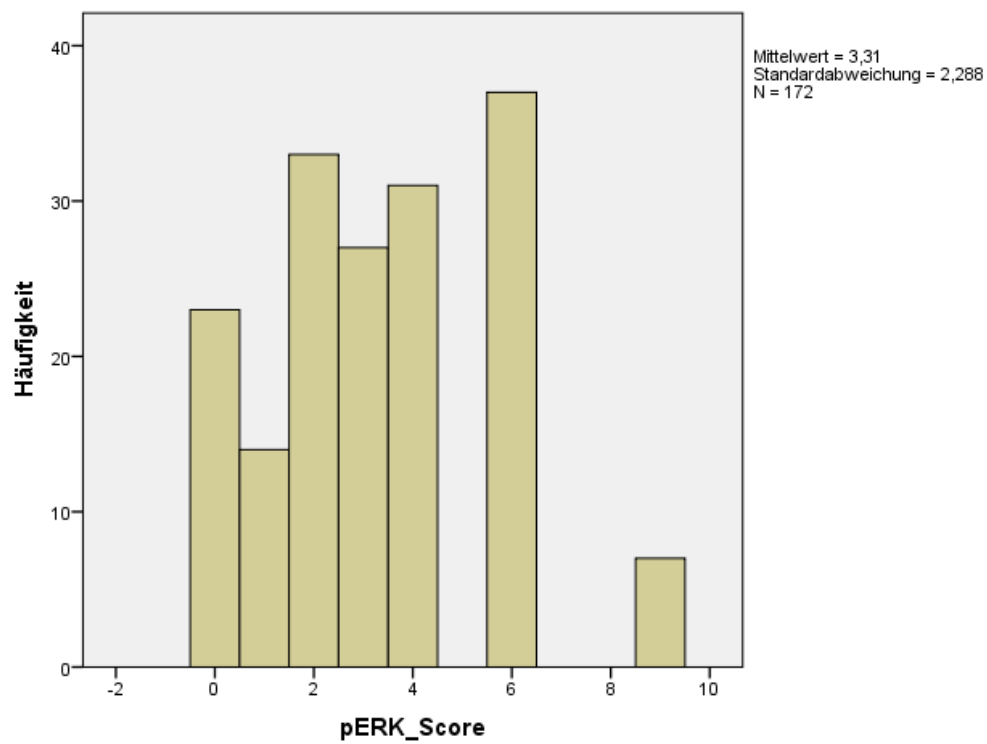


Abbildung 5: Verteilungshistogramm der Medianwerte des pERK-Scores

In 172 Proben konnte der pERK-Status ermittelt werden (89,1%).
149 davon (87,1%) fielen positiv aus (Abb. 5).

3.3 Korrelationsanalyse

3.3.1 HER2-Dako-Score, pAKT und pERK

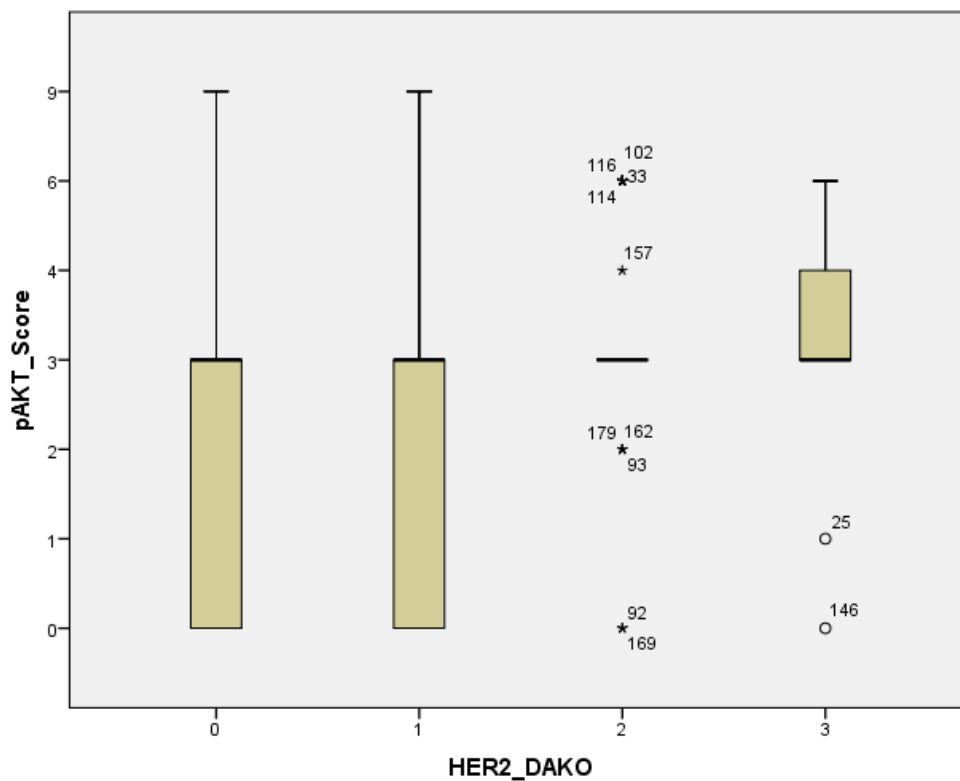


Abbildung 6: Korrelation des pAKT-Scores mit dem HER2-DAKO-Score

Der HER2-DAKO-Score korrelierte signifikant mit dem pAKT-Score ($p=0,04$) sowie mit der pAKT-Positivität ($p=0,035$). Der Boxplot (Abb. 6) weist insbesondere auf ein Vorliegen eines höheren pAKT-Scores bei starker HER2-Expression von 3+ hin.

Ein signifikanter Zusammenhang zu pERK-Score ($p=0,288$) bzw. pERK-Positivität ($p=0,551$) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

(Übersicht über alle Korrelationsanalysen in Tabelle 5)

Tabelle 5: Korrelationsanalysen

Spearman-RHO	HER2-DAKO	HER2-Ratio	HER2-Positivität	EGFR	pERK-Score	pERK-Positivität	pAKT-Score	pAKT-Positivität
HER2-DAKO								
KK	1,00	0,37	0,905	0,88	0,64	0,092	0,202	0,236
Sig. (2-seitig)	-	0,809	0,000	0,299	0,404	0,231	0,008	0,002
N	176	45	176	141	171	171	172	172
HER2-Ratio								
KK	0,037	1,00	-	-0,184	0,193	-0,153	-0,80	0,00
Sig. (2-seitig)	0,809	-	-	0,331	0,210	0,321	0,605	1,00
N	45	45	45	30	44	44	44	44
HER2-Positivität								
KK	0,905	-	1,00	0,042	0,081	0,046	0,157	0,161
Sig. (2-seitig)	0,00	-	-	0,624	0,289	0,553	0,039	0,034
N	176	45	176	141	171	171	172	172
EGFR								
KK	0,088	-0,184	0,042	1,00	0,096	-0,028	0,067	-0,011
Sig. (2-seitig)	0,299	0,331	0,624	-	0,260	0,746	0,431	0,901
N	141	30	141	156	138	138	139	139
pERK-Score								
KK	0,64	0,193	0,081	0,096	1,00	0,598	0,288	0,234
Sig. (2-seitig)	0,404	0,210	0,289	0,260	-	0,00	0,00	0,002
N	171	44	171	138	172	172	171	171
pERK-Positivität								
KK	0,092	-0,153	0,046	-0,028	0,598	1,00	0,264	0,317
Sig. (2-seitig)	0,231	0,321	0,553	0,746	0,00	-	0,00	0,00
N	171	44	171	138	172	172	171	171
pAKT-Score								
KK	0,202	-0,80	0,157	0,067	0,288	0,264	1,00	0,80
Sig. (2-seitig)	0,008	0,605	0,039	0,431	0,00	0,00	-	0,00
N	172	44	172	139	171	171	173	173
pAKT-Positivität								
KK	0,236	0,00	0,161	-0,011	0,234	0,317	0,80	1,00
Sig. (2-seitig)	0,002	1,00	0,034	0,901	0,002	0,00	0,00	-
N	172	44	172	139	171	171	173	173
KK: Korrelationskoeffizient, Sig.: Signifikanz, N: Patientenanzahl								

3.3.2 pAKT und pERK

Zwischen pAKT-Score und pERK-Score ($p=0,001$) sowie pERK-Positivität ($p=0,001$) ließen sich ebenfalls signifikante Korrelationen feststellen.

Ebenso war dies der Fall zwischen pAKT-Positivität und pERK-Score ($p=0,002$) sowie pERK-Positivität ($0,001$).

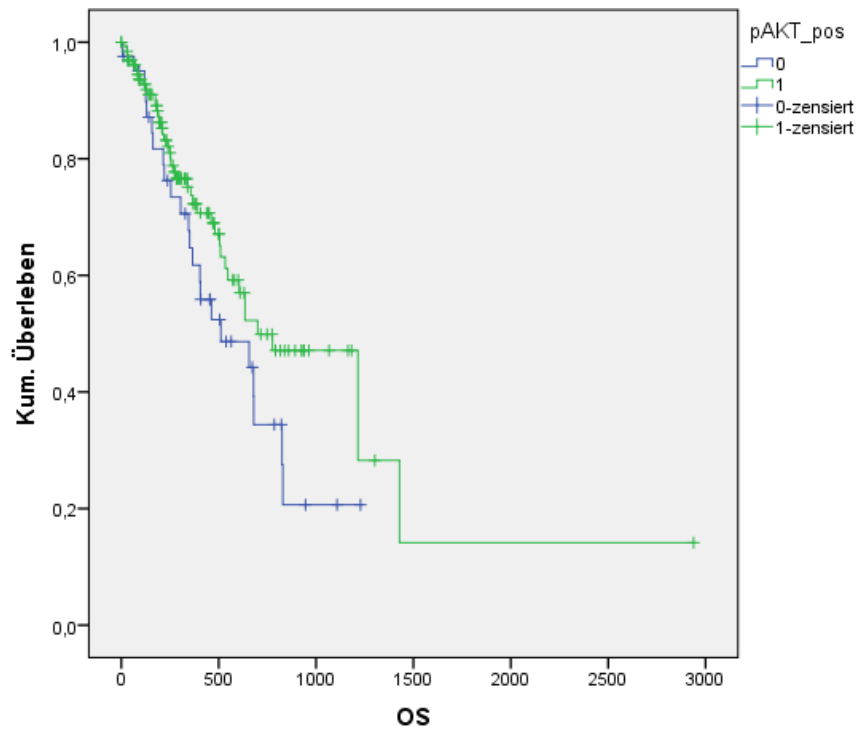


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens bei pAKT-positivem als auch pAKT-negativem Tumor im Gesamtkollektiv

(Medianes OS: pAKT-positiv = 700 Tage (d), pAKT-negativ = 511 d ($p=0,108$))

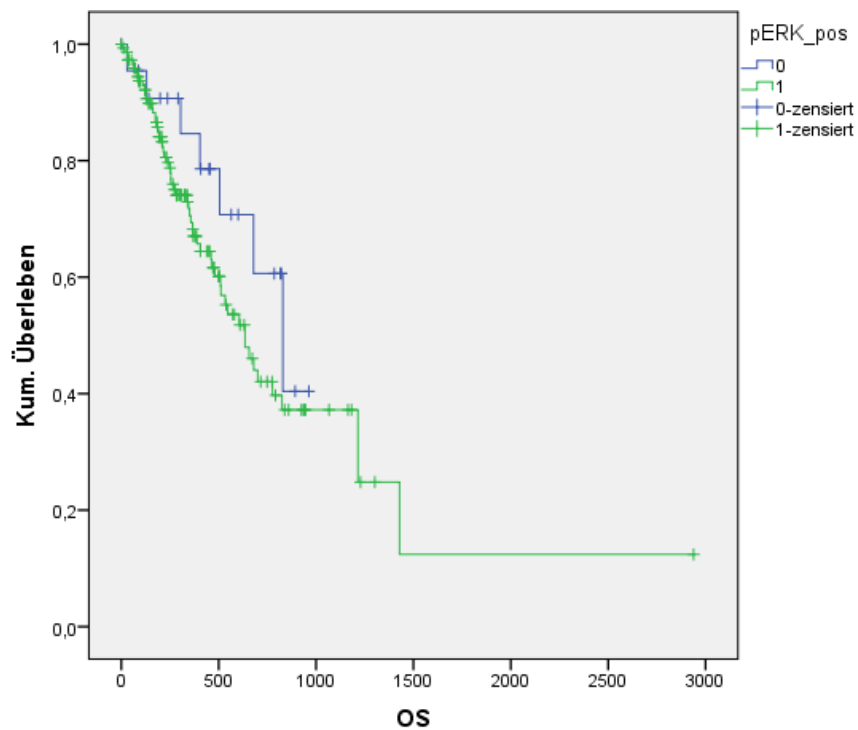


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei pERK-positivem als auch bei pERK-negativem Tumor im Gesamtkollektiv

(medianes OS: pERK-positiv = 635 d, pERK-negativ = 829 d ($p=0,236$))

3.4 Überlebensanalysen

3.4.1 Gesamtüberleben und time to treatment failure des Gesamtkollektivs

Innerhalb des Gesamtkollektivs konnte weder zum OS ($p=0,17$) noch zur TTF ($p=0,801$) ein signifikanter Effekt der HER2-Positivität gefunden werden. Auch erwies sich der Effekt von pAKT-Score zu OS ($p=0,108$) (s. Abbildung 7) sowie zu TTF ($p=0,286$) als nicht-signifikant.

Für pERK-Score konnte ebenfalls keine Signifikanz zu OS ($p=0,236$) (s. Abbildung 8) oder zu TTF ($p=0,09$) festgestellt werden.

3.4.2 Gesamtüberleben und time to treatment failure in der Gruppe Stadium IV

Für die Subgruppe der initial metastasierten Fälle wurde ein nahe an der Signifikanz liegender Wert ($p=0,06$) für den Zusammenhang von HER2-Positivität und OS festgestellt (s. Abbildung 9).

Der Zusammenhang von HER2-Positivität und TTF erwies sich als nicht-signifikant ($p=0,53$) (s. Abbildung 10).

Auch der Zusammenhang von pAKT-Score zum OS erzielte einen annähernd signifikanten Wert ($p=0,063$) (s. Abbildung 11), zu TTF jedoch nicht ($p=0,109$) (s. Abbildung 12).

pERK-Score hing weder mit OS ($p=0,644$) (s. Abbildung 13) noch mit TTF ($p=0,259$) (s. Abbildung 14) signifikant zusammen.

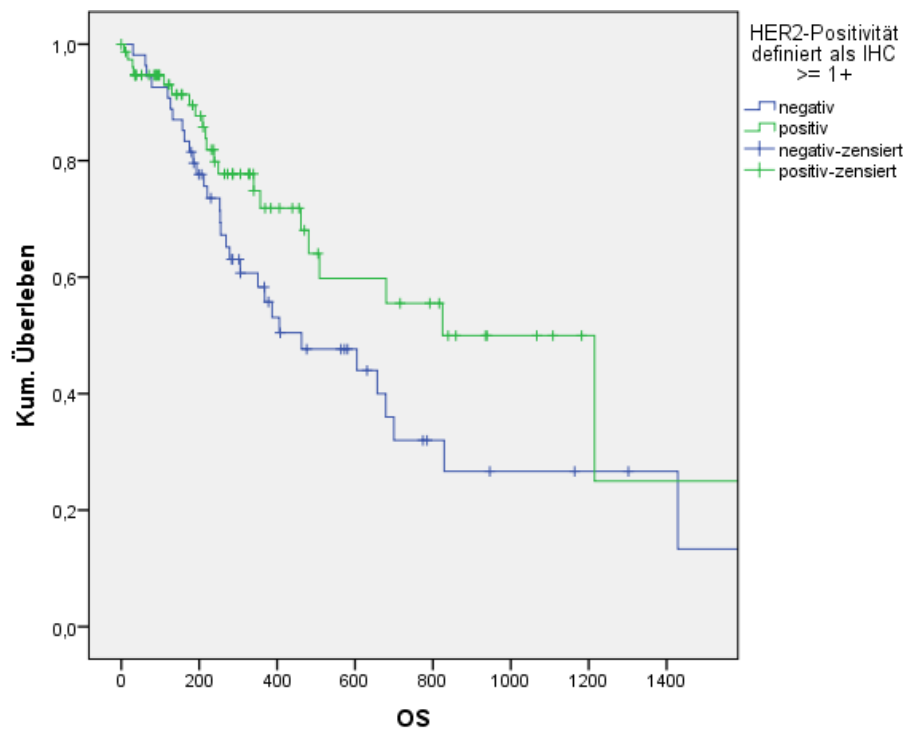


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei HER2-positivem als auch bei HER2-negativem Tumor im Stadium IV
(Medianes OS: HER2-positiv = 825 d, HER2-negativ = 463 d ($p=0,06$))

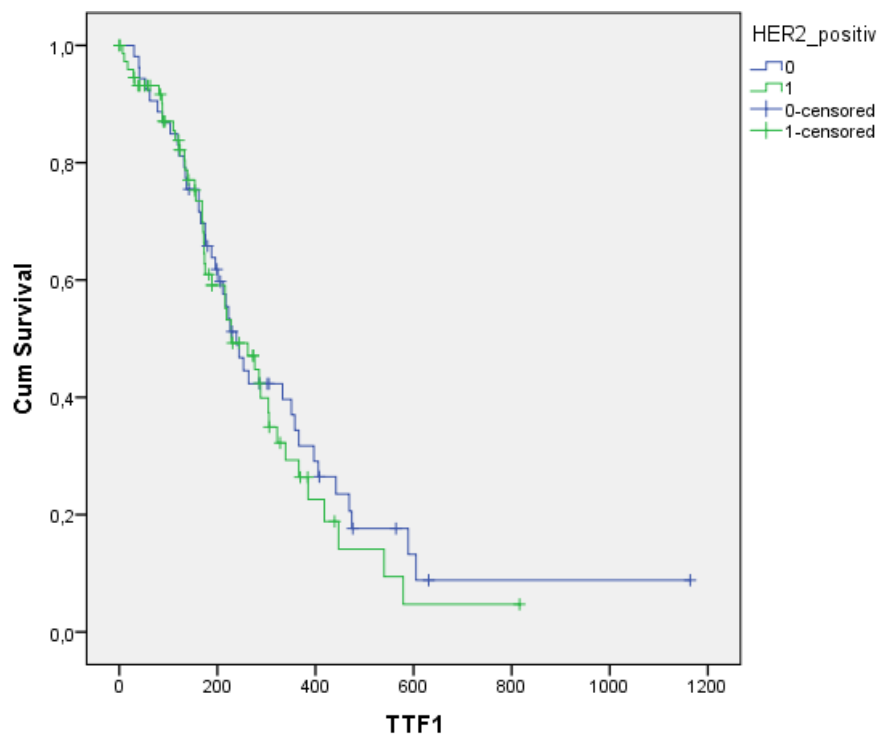


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve der time to Treatment Failure bei HER2-positivem als auch bei HER2-negativem Tumor im Stadium IV
(Mediane TTF: HER2-positiv = 228 d, HER2-negativ = 239 d ($p=0,53$))

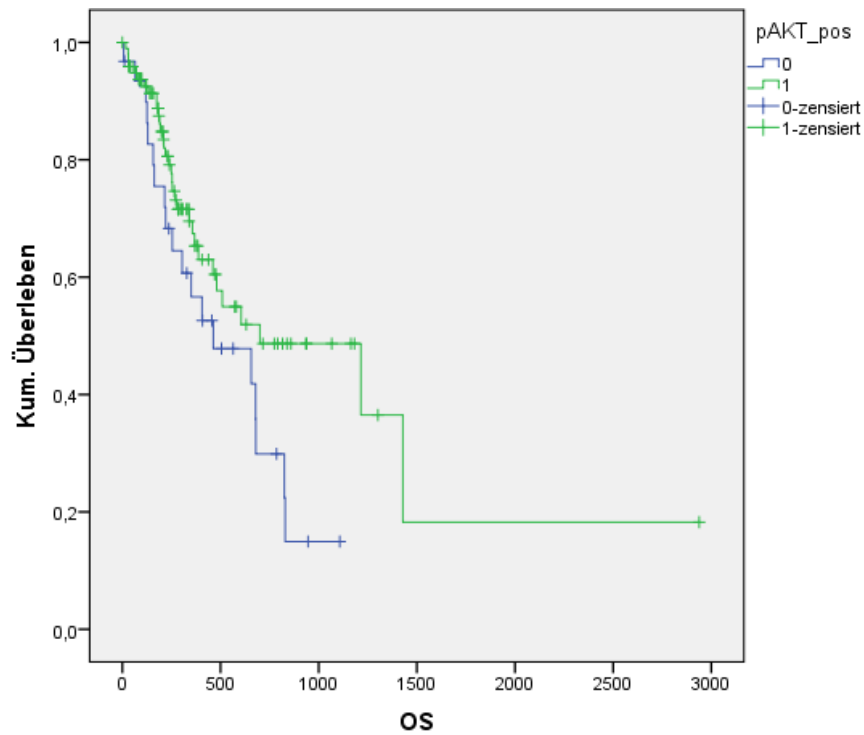


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei pAKT-positivem als auch bei pAKT-negativem Tumor im Stadium IV
(Medianes OS: pAKT-positiv = 700 d, pAKT-negativ 463 d ($p=0,063$))

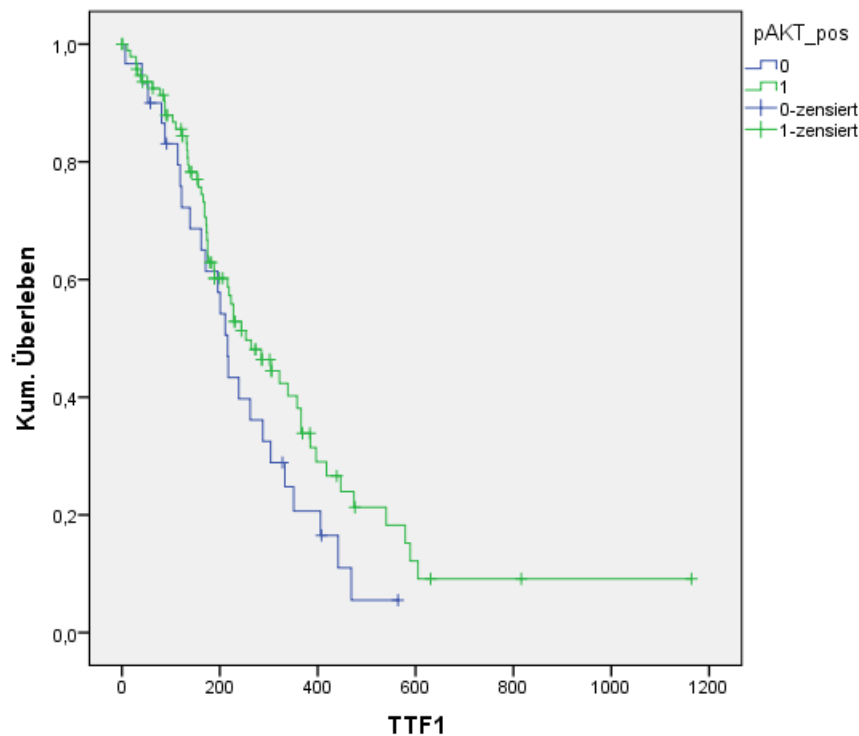


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve der time to Treatment Failure bei pAKT-positivem als auch bei pAKT-negativem Tumor im Stadium IV
(Mediane TTF: pAKT-positiv = 253 d, pAKT-negativ = 216 d ($p=0,109$))

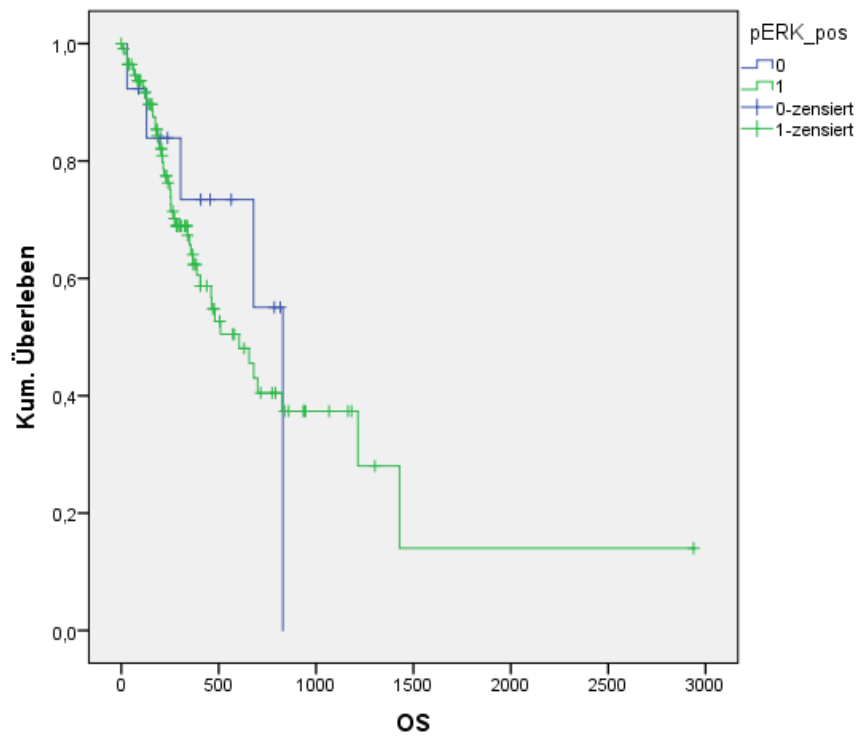


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei pERK-positivem als auch bei pERK-negativem Tumor im Stadium IV
(Medianes OS: pERK-positiv = 605 d, pERK-negativ = 829 d ($p=0,644$))

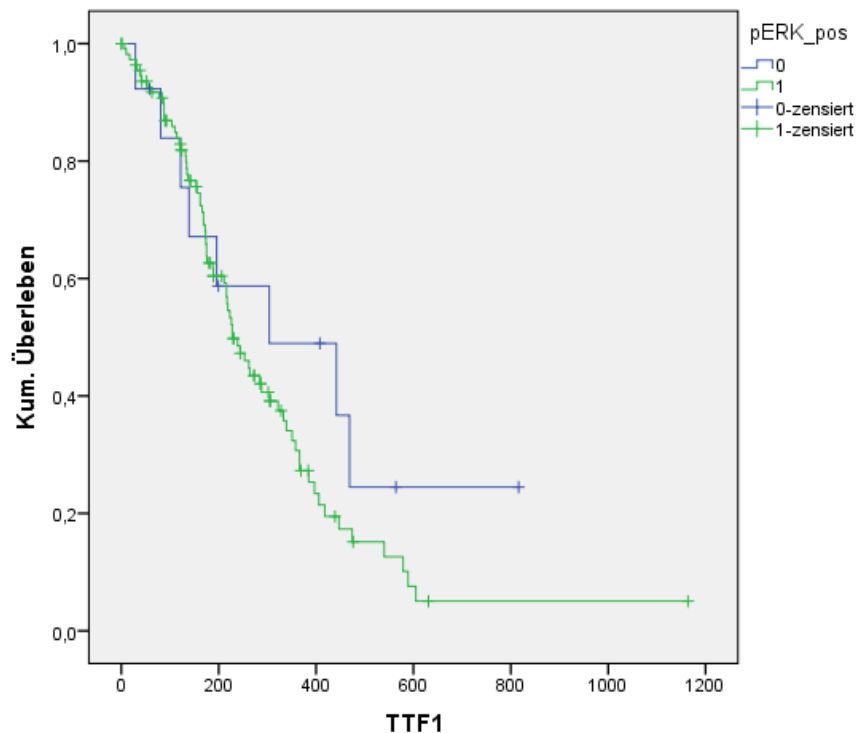


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve der time to Treatment Failure bei pERK-positivem als auch bei pERK-negativem Tumor im Stadium IV
(Mediane TTF: pERK-positiv = 228 d, pERK-negativ = 304 d ($p=0,259$))

4. Diskussion

4.1 Epidemiologische Auswertung

In dieser Arbeit liegt der Anteil der weiblichen Patienten bei 44,8 %, was geringfügig von den bisherigen Zahlen in der Literatur abweicht, die in einem Bereich zwischen 48 und 90 % liegen (Ferguson et al. 2000, Yoshida et al. 2016).

Die Literatur gibt als medianes Erkrankungsalter für Lungenkarzinome einen Wert um das 70. Lebensjahr herum an. Kaatsch et al. geben im Krebsbericht des Robert-Koch-Instituts für das Jahr 2012 einen mittleren Erkrankungsbeginn für alle Neoplasien, die aus dem Epithel des respiratorischen Systems hervorgehen, von 70 Jahren bei Männern und von 69 Jahren bei Frauen an (Kaatsch et al. 2015). Im vorliegenden Kollektiv betrug das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung 60,3 Jahre.

4.2 HER2-Überexpression, -Amplifikation, -Mutation

Von den 176 Proben, deren HER2-Status erfolgreich immunhistochemisch untersucht werden konnte, erwiesen sich 102 (57,9%) als positiv im Sinne eines IHC-Score $\geq 1+$. Ein IHC-Score $\geq 2+$ wurde in insgesamt 53 Fällen (30%) nachgewiesen werden. 13 davon (7,4%) zeigten eine starke Färbung mit 3+.

Frühere Studien beziffern die Häufigkeit einer HER2-Überexpression $\geq 1+$ beim NSCLC mit 40-75%. Diesen Studien zufolge tritt eine Überexpression von 2+ in 18-46% bzw. eine Überexpression von 3+ in 2-13% aller Fälle auf (Hirsch et al. 2002, Heinmöller et al. 2003, Pellegrini et al. 2003). Dabei wurden Patienten mit unterschiedlichen NSCLC-Histologien und – bis auf eine Studie – aller Tumorstadien eingeschlossen. Somit unterstützen diese Ergebnisse den derzeitigen Forschungsstand der Literatur.

Von den 53 Proben mit einem IHC-Score $\geq 2+$ konnte in 45 Fällen erfolgreich der Amplifikationsstatus sowie in 34 Fällen erfolgreich der Mutationsstatus analysiert werden. Die geringere Anzahl erfolgreicher Genomsequenzierung im Vergleich zum Amplifikationsstatus war dem Materialverbrauch durch vorherige oder gleichzeitige, mit höherer Priorität durchgeführte, diagnostische Untersuchung bei ohnehin typischerweise nur geringer Probengröße geschuldet.

Eine HER2-Amplifikation war in 4 Patientenproben (2,3%) feststellbar, während Mutationen von HER2 in keinem der Fälle gefunden wurden. Die Angaben der Literatur bezüglich der Amplifikationsrate von HER2 im NSCLC liegen zwischen 2-11% (Pellegrini et al. 2003, Heinmöller et al. 2003), was sich mit den von uns erhobenen Daten deckt.

Die Frequenz von HER2-Mutationen wird mit 2-4% angegeben (Buttita et al. 2006, Shigematsu et al. 2005, Mazières et al. 2013). Aufgrund der geringen Stichprobengröße und einer angenommenen Mutationsrate von 3% ergibt sich gemäß Bernoulli-Verteilung eine Wahrscheinlichkeit von 35%, dass keine Mutation unter den 34 Proben vorhanden war. Es ist demnach plausibel, dass tatsächlich keine Mutation vorgelegen hat.

4.3 Prognostische Bedeutung von HER2 bzw. pAKT zu OS und TTF im Stadium IV

4.3.1 HER2

Aufgrund der Erfahrungen zu HER2 bei Brustkrebspatientinnen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von HER2 bei Patienten mit Lungenkarzinom unternommen. So wurden im Zeitraum der letzten 20 Jahre mehrere Studien zu diesem Thema veröffentlicht, die Liu et al. in einer Meta-Analyse mit 40 Arbeiten verglichen und feststellten, dass einerseits ein Zusammenhang mit der HER2-Expression und einem schlechteren Outcome beim Adenokarzinom besteht, andererseits HER2 mit geringerem Gesamtüberleben in Stadium I und II beim NSCLC assoziiert ist (Liu et al. 2010).

Offen blieb damit die Frage, wie sich die prognostische Aussagekraft von HER2 konkret für das Adenokarzinom im fortgeschrittenen Stadium – sprich Stadium III und IV – darstellt.

Ein Zusammenhang der HER2-Überexpression mit einem verlängerten Gesamtüberleben ließ sich für Gesamtheit aus Patienten in Stadium III und IV nicht belegen, es ergab sich jedoch für die isolierte Gruppe der Patienten im Stadium IV ein klarer Trend ($p=0,06$). Für dieses spezielle Patientenkollektiv ist die Fragestellung in der Literatur noch nicht gesondert eruiert worden, die Ergebnisse stellen sich konträr zu den Erwartungen auf Basis bisheriger Studien dar, die überwiegend Patienten in frühen Tumorstadien einschlossen. In einer Studie von 2009 konnte anhand von 61 Adenokarzinom-Patienten und 23 Nicht-Adenokarzinom-Patienten im Stadium IIIb und IV kein signifikanter Zusammenhang

zwischen HER2-Expression und Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Xu et al. 2009). Calikusu et al. untersuchten ebenfalls 2009 61 NSCLC-Patienten im Stadium IIIb und IV. Sie kamen zu dem Schluss, dass hierbei HER2-Expression signifikant mit einem schlechteren overall survival verbunden ist (Calikusu et al. 2009). Der in unserer Arbeit aufgezeigte Trend hin zu einem besseren Gesamtüberleben bei Stadium-IV-Patienten stellt sich gegen die bisherigen Erkenntnisse der Literatur und kann eventuell in dieser Patientengruppe als neuer Marker für ein verbessertes Gesamtüberleben eingesetzt werden.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass unsere Ergebnisse zunächst in einer zweiten, ebenfalls prospektiven Patientenkohorte validiert werden müssen.

Der Patienteneinschluss für unsere Kohorte erfolgte prospektiv, so dass typische Verzerrungen retrospektiver Analysen vermieden wurden.

Jedoch sind auch systematische Fehler aufgrund des Designs und der Ausführung dieser Arbeit möglich:

- Ein Zentrumsbias aufgrund der Rolle des Universitätsklinikums als überregionales Schwerpunktzentrum könnte zu einer Verzerrung des Patientenkollektivs geführt haben,
- ein Überlebensbias,
- ein Selektionsbias, da die Selektion der Patienten sich hauptsächlich nach dem Krankheitsstadium richtete und
- ein Attrition Bias, bedingt durch ein vorzeitiges Ausscheiden der Patienten aus der Untersuchung, bevor ein Endpunkt wie z.B. das Versterben erreicht wurde.

4.3.2 pAKT

Die phosphorylierte Proteinkinase B (pAKT) wurde bereits mehrfach auf einen möglichen prognostischen Wert hin untersucht.

Die bisherigen Daten stellen sich teilweise widersprüchlich zu den Erkenntnissen dieser Arbeit dar, wonach es einen pAKT-abhängigen Trend hin zu einem verlängerten Gesamtüberleben im Stadium IV gibt. Bei genauerer Betrachtung relativieren sich diese Widersprüche jedoch.

David et al. postulierten in einer retrospektiven Studie von 2004, dass pAKT ein unabhängiger Marker für ein geringeres Gesamtüberleben darstelle. Die Untersucher bedienten sich dabei eines anderen Scores als des in dieser Arbeit verwendeten: Als pAKT-positiv

wurden in dieser Studie alle Proben angesehen, die eine lichtmikroskopisch klar zu erkennende Färbung von Zytoplasma und/oder Nukleus aufgrund der immunhistochemischen Anfärbung zeigten. Das von dieser Arbeit abweichende Scoring erschwert eine direkte Vergleichbarkeit.

Außerdem bezog sich die Stichprobe stadienunabhängig auf alle NSCLC-Typen und nicht nur auf das fortgeschrittene oder metastasierte Adenokarzinom (David et al. 2004).

Auch wenn die Untersuchung von David et al. einen signifikanten Überlebensnachteil für Patienten mit pAKT-positivem Tumor postuliert, muss als Einschränkung dessen genannt werden, dass alle Patienten mit Stadium IV-Tumor als pAKT-negativ eingestuft worden sind. Diese Ergebnisse ständen damit nicht im Gegensatz zu den unsrigen, welche pAKT-abhängigen Überlebensvorteil im Stadium IV stützen.

Eine 2007 veröffentlichte, retrospektive Studie untersuchte die Verbindung des pAKT-Expressionsgrades auf das overall survival beim NSCLC im Stadium IV. Hierbei wurde ein signifikanter Zusammenhang hin zu einem schlechteren Outcome postuliert (Lim et al. 2007). Zu erwähnen ist, dass diese Arbeit insgesamt nur 15 Patienten mit Adenokarzinom im Stadium IV einschloss. Belastbare Aussagen über diese Population sind daher mit Vorsicht zu treffen.

Im Vergleich zur Untersuchung von Lim et al. besteht der klare Vorteil der hier vorliegenden Studie darin, dass sie mit 129 prospektiv bezüglich der Biomarkerprävalenz untersuchten Patienten, die sich allesamt im Stadium IV befanden, eine breitere statistische Abstützung aufweist und damit belastbarere Aussagen zulässt. Somit könnte auch pAKT als ein positiv prognostischer Marker beim Adenokarzinom im Stadium IV genutzt werden. Weitere wissenschaftliche Überprüfung dieser Hypothese ist jedoch zu empfehlen, um den Trend zu bestätigen.

4.4 Zusammenhang von HER2 und pAKT

Ein signifikanter Zusammenhang der HER2-Expression mit dem Nachweis von phosphoryliertem AKT, dem Biomarker für eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, konnte herausgearbeitet werden. Die Beziehung von HER2-Expression und dem Nachweis von phosphoryliertem ERK, dem Biomarker der MAKK-Aktivierung, blieb hingegen nicht signifikant. Eine daraus ableitbare Hypothese könnte sein, dass im Falle einer erhöhten Expression von HER2 vor allem der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg aktiviert wird.

Sukawa et al. haben 2014 Tumorproben von Patienten mit Magenkarzinom untersucht und kamen analog zu unserer Arbeit zu dem Schluss, dass auch bei Magenkarzinomen die Expression von HER2 signifikant mit der Aktivierung von pAKT vergesellschaftet ist. Sie schlossen daraus, dass der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ein entscheidender Weg der Signalweiterleitung ist, und vermuteten, durch weitere Untersuchungen neue prädiktive Faktoren für die Trastuzumab-Therapie innerhalb dieser Signalwege aufdecken zu können (Sukawa et al. 2014).

Untersuchungen zum Mammakarzinom in den letzten Jahren bestätigten, dass genetische Veränderungen einzelner Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs mit Resistenz gegenüber Trastuzumab assoziiert sind (Nagata et al. 2004). Diese Beobachtung führte zur Überlegung, ob ein dualer Therapieansatz mittels Trastuzumab und mTOR-Inhibitoren eine effektivere Blockade der Signalweiterleitung erzielen könne. André et al. publizierten 2014 in der BOLERO-3-Studie, dass die Ergänzung des Therapieregimes Trastuzumab/Vinorelbin um den mTOR-Inhibitor Everolimus eine signifikante Steigerung des progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom erzielen konnte (André et al. 2014).

Bei Lungenkarzinomen gelang es in den vorliegenden, frühen Studien aus dem Jahr 2005 nicht, durch eine Mono- oder Kombinationstherapie mit Trastuzumab einen klinischen Effekt auf das Gesamtüberleben im Kollektiv mit HER2-Überexpression im Sinne eines IHC-Scores von $\geq 2+$ nachzuweisen (Clamon et al. 2005, Gatzemeier et al. 2004). Zu diskutieren wäre, ob die Bedeutung der HER2-Signalaktivierung in der Biologie des Lungenkarzinoms weniger zentral als beim Mamma- oder Magenkarzinom ist, ob etwa nachgeschaltete Signalwege trotz HER2-Inhibition aktiviert bleiben oder ob rasch Resistenzen auftreten. Gestützt auf die oben genannten Erkenntnisse und die in dieser Arbeit vorgebrachten Hypothese, dass bei HER2-Überexpression bevorzugt der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg aktiviert wird, könnten nun weitere Untersuchungen dahin gehen, ob eine Kombinationstherapie aus Trastuzumab und einer weiteren zielgerichteten Substanz wie etwa mTOR-Inhibitoren Effektivität zeigen könnte. Präklinische Daten hierzu sind nicht bekannt. In einer aktuellen Phase-II-Studie (Nogova et al. 2014) wird die Idee einer gegen HER2-gerichteten Therapie beim Lungenkarzinom wieder aufgegriffen. Geprüft wird die Kombination von Trastuzumab mit einem Heat-Shock-Protein-Inhibitor, Ergebnisse liegen noch nicht vor.

5. Zusammenfassung

Lungenkrebs gehört zu den häufigsten und tödlichsten Krebsarten. Schon heute ließ sich ein genaueres Verständnis der molekularen Veränderungen bestimmter Untergruppen von metastasiertem Lungenkrebs in zielgerichtete und wirksamere Behandlungen umsetzen.

In dieser Arbeit wurde bei fortgeschrittenen Adenokarzinomen der Lunge die zellmembranständige Tyrosinkinase human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) – eine etablierte Zielstruktur für die Behandlung vom fortgeschrittenem Brust- und Magenkrebs – und zwei der von ihr ausgehenden Transduktionskaskaden, namentlich der Mitogen-activated protein kinase (MAPK)- und Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)/ Proteinkinase B (AKT)/ Mechanistic target of rapamycin (mTOR)-Signalweg, untersucht. Es wurde geprüft, inwiefern die klinischen Verläufe mit Expression bzw. Aktivierung der jeweiligen Signalmoleküle zusammenhängen.

In diesem 193 Patienten umfassenden, prospektiv untersuchten Kollektiv konnten 53 Fälle (30%) mit einem DAKO-Immunhistochemie (IHC)-Score $\geq 2+$ sowie vier Fälle (2,3%) mit Amplifikation des *HER2*-Gens nachgewiesen werden. Patienten im Stadium IV mit HER2-Positivität, definiert als IHC-Score $\geq 1+$, zeigten ein nahezu signifikant besseres Gesamtüberleben ($p=0,06$), das Gesamtkollektiv mit Einschluss von Patienten im Stadium III betrachtend blieb dieser Trend jedoch aus ($p=0,17$). Die Bedeutung von HER2 für Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom ist bislang noch nicht so spezifisch wie in dieser Arbeit beleuchtet worden. Das Ergebnis divergiert von anderen Studien, die bisher auf diesem Felde durchgeführt worden sind. Andererseits ging auch eine hohe Expression von pAKT, einem phosphorylierten Signalmolekül und Marker für die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, bei metastasierten Patienten tendenziell mit einem längeren Gesamtüberleben einher ($p=0,063$). Dies steht im Widerspruch zu bisherigen Untersuchungen, die jedoch in der Regel an retrospektiven Kollektiven mit sehr hohem Anteil früher Tumorstadien erfolgten. Weitere Untersuchungen könnten helfen, diese neue Erkenntnis zu untermauern und pAKT als einen neuen prognostischen Parameter für das metastasierte Adenokarzinom zu etablieren. Darüber hinaus zeigte sich, dass der HER2-DAKO-Score mit dem Nachweis von pAKT ($p=0,034$), nicht aber mit dem Nachweis von phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) signifikant korrelieren. Daraus könnte man ableiten, dass bei HER2-überexprimierenden Tumoren vor allem der Signalweg via pAKT aktiviert wird. Ließe sich dies weiter bestätigen, könnte eine duale Therapie erwogen werden, die gegen beide Stellen der Signalkette gerichtet ist. Bei anderen Krebsarten erwies sich dieser Ansatz als vorteilhaft für das Gesamtüberleben.

6. Literaturverzeichnis

1. André F., O'Regan, R., Ozguroglu, M., Toi, M., Xu, B., Jerusalem, G., Masuda, N., Wilks, S., Arena, F., Isaacs, C., Yap, Y., Papai, Z., Lang, I., Armstrong, A., Lerzo, G., White, M., Shen, K., Litton, J., Chen, D., Zhang, Y., Ali, S., Taran, T., Gianni, L. (2014): Everolimus for women with Trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 6, 580 – 591.
2. Bang, Y., Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E., Hill, J., Lehle, M., Rüschoff, J., Kang, Y. (2010): Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376, 687 – 697.
3. Buttita, F., Barassi, F., Fresu, G., Felicioni, L., Chella, A., Paolizzi, D., Lattanzio, G., Salvatore, S., Campese, P., Rosini, S., Iarussi, T., Mucilli, F., Sacco, R., Mezzetti, A., Marchetti, A. (2006): Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: Mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer* 119, 2586 – 2591.
4. Calikusu, Z., Yildirim, Y., Akcali, Z., Sakalli, H., Bal, N., Unal, I., Ozyilkan, O. (2009): The effect of HER2 expression on cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 97.
5. Cataldo, V., Gibbons, D., Pérez-Soler, R., Quintás-Cardama, A. (2011): Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer with Erlotinib or Gefitinib. *N Engl J Med* 364, 947 – 955.
6. Clamon, G., Herndon, J., Kern, J., Govindan, R., Garst, J., Watson, D., Green, M. (2005): Lack of trastuzumab activity in nonsmall cell lung carcinoma with overexpression of erb-B2: 39810: a phase II trial of Cancer Leukemia Group B. *Cancer* 103, 1670 – 1675.
7. Clynes, R., Towers, T., Presta, L., Ravetch, J. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443 – 446.

8. Dako (2015):
HercepTest: Interpretation Manual - Breast Cancer
http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf
9. David, O., Jett, J., LeBeau, H., Dy, G., Hughes, J., Friedman, M., Brody, A. (2004):
Phospho-Akt Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer confers significant stage-independent survival disadvantage.
Clin Cancer Res 10, 6865 – 6871.
10. De Grève, J., Teugels, E., Geers, C., Decoster, L., Galdermans, D., De Mey, J., Everaert, H., Umelo, I., In't Veld, P., Schallier, D. (2012):
Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu.
Lung Cancer 76, 123 – 127.
11. EMA (2014):
http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf
12. EMA (2015):
Assessment Report: Xalkori.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/002489/WC500200132.pdf
13. Eisenhauer, E., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., Verweil J. (2009):
New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1).
Eur J Cancer 45, 228 – 247.
14. Faivre, S., Kroemer, G., Raymond, E. (2006):
Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents
Nat Rev Drug Discov 5, 671 – 688.
15. Ferguson, M., Wang, J., Hoffman, P., Haraf, D., Olak, J., Masters, G., Vokes, E. (2000):
Sex-associated differences in survival of patients undergoing resection of lung cancer.
Ann Thorac Surg 69, 245 – 249.

16. Gatzemeier, U., Groth, G., Butts, C., Van Zandwijk, N., Shepherd, F., Ardizzoni, A., Barton, C., Ghahramani, P, Hirsh, V. (2004):
Randomized phase II trial of gemcitabine–cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer.
Ann Oncol 15, 19 – 27.
17. Gazdar, A. (2009):
Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors
Oncogene 28, 24 – 31.
18. Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W., Nicholson, A., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V. (2016):
The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer.
J Thorac Oncol 11, 39 – 51.
19. Graus-Porta, D., Beerli, R., Daly, J., Hynes, N. (1997):
ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.
EMBO J 16, 1647 – 1655.
20. Bertram, H., Heidinger, O., Heidrich, J., Kajüter, H., Krieg, V., Mattauch, V. (2015):
Epidemiologisches Krebsregister Nordrhein-Westfalen Jahresbericht 2015 mit Datenreport 2013.
Epidemiologisches Krebsregister NRW gGmbH (Hrsg.); November 2015.
http://www.krebsregister.nrw.de/fileadmin/user_upload/dokumente/veroeffentlichungen/Report_2015/EKR_NRW_2015_Jahresbericht_Internet_pro.pdf
21. Heinmöller, P., Gross, C., Beyser, K., Schmidtgen, C., Maass, G., Pedrocchi, M., Rüschoff, J. (2003):
HER2 Status in Non-Small Cell Lung Cancer: Results from Patient Screening for Enrollment to a Phase II Study of Herceptin.
Clin Cancer Res 9, 5238 – 5243.
22. Herbst, R., Heymach, J., Lippman, S. (2008):
Lung cancer.
N Engl J Med 359, 1367 - 1380.

23. Hirsch, F., Varella-Garcia, M., Franklin, W., Veve, R., Chen, L., Helfrich, B., Zeng, C., Baron, A., Bunn, P. (2002):
Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas.
Br J Canc 86, 1449 – 1456.
24. Hyman, D., Puzanov, I., Subbiah, V., Faris, J., Chau, I., Blay, J., Wolf, J., Raje, N., Diamond, E., Hollebecque, A., Gervais, R., Elez-Fernandez, M., Italiano, A., Hofheinz, R., Hidalgo, M., Chan, E., Schuler, M., Lasserre, S., Makrutzki, M., Sirzen, F., Veronese, M., Tabernero, J., Baselga, J. (2015):
Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations
N Engl J Med 373, 726 – 736.
25. Jorissen, R., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, Thomas., Ward, C., Burgess, A. (2003):
Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling.
Exp Cell Res 284, 31 – 53.
26. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S. Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U. (2015):
Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf;jsessionid=8101E03E210D65F6DD1AFB0548A0E411.2_cid298?__blob=publicationFile
27. Kaplan, E., Meier, P. (1958):
Nonparametric estimation from incomplete observations.
J Amer Statist Assn 53, 457 – 481.
28. Lewis, G., Figari, I., Fendly, B., Wong, W., Carter, Paul., Gorman, C., Shephard, H. (1993):
Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185 nEu2 monoclonal antibodies.
Cancer Immunol Immunother 37, 255 – 263.

29. Lim, W., Zhang, W., Miller, C., Watters, J., Gag, F., Viswanathan, A., Govinidan, R., McLeod, H. (2007):
PTEN and phosphorylated AKT expression and prognosis in early- and late-stage non-small cell lung cancer.
Oncol Rep 17, 853 – 857.
30. Liu, L., Shao, X., Gao, W., Bai, J., Wang, R., Huang, P., Yin, Y., Liu, P., Shu, Y. (2010):
The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data.
J Thorac Oncol 5, 1922 – 1932.
31. Lynch, T., Bell, D., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R., Brannigan, B., Harris, P., Haserlat, S., Supko, J., Haluska, F., Louis, D., Christiani, D., Settleman, J., Haber, D. (2004):
Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib.
N Engl J Med 2004 350, 2129 – 2139.
32. Marchetti, A., Milella, M., Felicioni, L., Cappuzzo, F., Irtelli, L., Del Grammastro, M., Sciarrotta, M., Malatesta, S., Nuzzo, C., Finocchiaro, G., Perrucci, B., Carlone, D., Gelibter, A., Ceribelli, A., Andrea Mezzetti, A., Iacobelli, S., Cognetti, F., and Buttitta F. (2009):
Clinical Implications of KRAS Mutations in Lung Cancer Patients Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors: An Important Role for Mutations in Minor Clones
Neoplasia 11, 1084 – 1092.
33. Mazières, J., Peters, S., Lepage, B., Cortot, A., Barlesi, F., Beau-Faller, M., Besse, B., Blons, H., Mansuet-Lupo, A., Urban, T., Moro-Sibilot, D., Dansin, E., Chouaid, C., Wislez, M., Diebold, J., Felip, E., Rouquette, I., Milia, J., Gautschi, O. (2013):
Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives.
J Clin Oncol 31, 1997 – 2003.
34. Mazières, J., Zalcman, G., Crinò, L., Biondani, P., Barlesi, F., Filleron, T., Dingemans, A., Léna, H., Monnet, I., Rothschild, S., Cappuzzo, F., Besse, B., Thiberville, L., Rouvière, D., Dziadziuszko, R., Smit, E., Wolf, J., Spirig, C., Pecuchet, N., Leenders, F., Heuckmann, J., Diebold, J., Milia, J., Thomas, R., Gautschi, O. (2015):
Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort.
J Clin Oncol 33, 992 – 999.

35. Moasser, M. (2007):
Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics
Oncogene 26, 6577 – 6592.
36. Morgensztern, D., Ng, S., Gao, F., Govindan, R. (2010):
Trends in Stage Distribution for Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A National Cancer Database Survey
J Thorac Oncol 5, 29 – 33.
37. Nagata, Y., Lan, K., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F., Sahin, A., Klos, K., Li, P., Monia, B., Nguyen, N., Hortobagyi, G., Hung, M., Yu, D. (2004):
PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients.
Cancer Cell 6, 117 – 127.
38. Nogova, L., Gardizi, M., Bos, M., Scheffler, M., Mattonet, C., Heukamp, L. (2014):
TRY: a phase II study to evaluate safety and efficacy of combined trastuzumab and AU922 in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with HER2 overexpression or amplification or mutation.
J Clin Oncol 32, 8109.
39. Pao, W., Wang, T., Riely, G., Miller, V., Pan, Q., Ladanyi, M., Zakowski, M., Heelan, R., Kris, M., Varmus, H. (2005):
KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib.
PLoS Med 2, 57 – 61.
40. Pellegrini, C., Falleni, M., Marchetti, A., Cassani, B., Miozzo, M., Buttitta, F., Roncalli, M., Coggi, G., Bosari, S. (2003):
HER-2/Neu Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer: A comprehensive Evaluation by Real Time Reverse Transcription-PCR, Fluorescence in Situ Hybridization, and Immunohistochemistry.
Clin Cancer Res 9, 3645 – 3652.
41. Planchard, D., Besse, B., Groen, H., Souquet, P., Quoix, E., Baik, C., Barlesi, F., Kim, T., Mazieres, J., Novello, S., Rigas, J., Upalawanna, A., D'Amelio, A., Zhang, P., Mookerjee, B., Johnson, B. (2016):
Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicenter phase 2 trial.
Lancet 17, 984 – 993.

42. Reungwetwattana, T., Dy, G. (2013):
Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer
J Carcinog 2013, 12 - 22.
43. Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., Hu, Y., Tan, Z., Stokes, M., Sullivan, L., Mitchell, J., Wetzel, R., Macneil, J., Ren, J., Yuan, J., Bakalarski, C., Villen, J., Kornhauser, J., Smith, B., Li, D., Zhou, X., Gygi, S., Gu, T., Polakiewicz, R., Rush, J, Comb, M. (2007):
Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer
Cell 2007 131, 1190 – 1203.
44. Sàez, A., Andreu, F., Seguí, M., Barè, M., Fernàndez, S., Dinarès, C., Rey, M. (2006):
HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) compared with fluorescence in situ hybridization (FISH) in breast cancer – A study of two hundred cases.
Breast 15, 519 – 527.
45. Schuler, M., Yang, J., Park, K., Bennouna, J., Chen, Y., Chouaid, C., De Marinis, F., Feng, J., Grossi, F., Kim, D., Liu, X., Lu, S., Strausz, J., Vinnyk, Y., Wiewrodt, R., Zhou, C., Wang, B., Chand, V., Planchard, D. (2015):
Afatinib beyond progression in patients with non-small-cell lung cancer following chemotherapy, erlotinib/gefitinib and afatinib: phase III randomized LUX-Lung 5 trial.
Ann Oncol 27, 417 – 423.
46. Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, W., Ullrich, A., McGuire, W. (1987):
Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene.
Science 235, 177 – 182.
47. Shaw, A., Kim, D., Nakagawa, K., Seto, T., Crinó, L., Ahn, M., De Pas, T., Besse, B., Solomon, B., Blackhall, F., Wu, Y., Thomas, M., O'Byrne, K., Moro-Sibilot, D., Camidge, D., Mok, T., Hirsh, V., Riely, G., Iyer, S., Tassell, V., Polli, A., Wilner, K., Jänne, P. (2013):
Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer.
N Engl J Med 368, 2385 – 2394.

48. Shaw, A., Kim, D., Mehra, R., Tan, D., Felip, E., Chow, L., Camidge, D., Vansteenkiste, J., Sharma, S., De Pas, T., Riely, G., Solomon, B., Wolf, J., Thomas, M., Schuler, M., Liu, G., Santoro, A., Lau, Y., Goldwasser, M., Boral, A., Engelman, J. (2014):
Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer.
N Engl J Med 370, 1189 – 1197.
49. Shaw, A., Ou, S., Bang, Y., Camidge, R., Solomon, B., Salgia, R., Riely, G., Varela-Garcia, M., Shapiro, G., Costa, D., Doebele, R., Le, L., Zheng, Z., Tan, W., Stephenson, P., Shreeve, M., Tye, L., Christensen, J., Wilner, K., Clark, J., Iafrate, A. (2014):
Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer
N Engl J Med 371, 1963 – 1971.
50. Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, I., Fong, K., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T., Minna, J., Gazdar, A. (2005):
Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas.
Cancer 65, 1642 – 1646.
51. Soda, M., Choi, Y., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., Mano, H. (2007):
Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer
Nature 448, 561 – 566.
52. Solomon, B., Mok, T., Kim, D., Wu, Y., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T., Iyer, S., Reisman, A., Wilner, K., Tursi, J., Blackhall, F. (2014):
First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer.
N Engl J Med 371, 2167 – 2177.
53. Stinchcombe, T., Johnson, G., (2014):
MEK inhibition in non-small cell lung cancer
Lung Cancer 86, 121 – 125.
54. Sukawa, Y., Yamamoto, H., Noshio, K., Ito, M., Igarashi, H., Naito, T., Mitsunashi, K., Matsunaga, Y., Takahashi, T., Mikami, M., Adachi, Y., Suzuki, H., Shinmura, Y. (2014):
HER2 Expression and PI3K-Akt Pathway Alterations in Gastric Cancer.
Digestion 89, 12 – 17.

55. Tanner, M., Gancberg, D., Di Leo, A., Larsimont, D., Rouas, G., Piccart, M., Isola, J. (2000):
Chromogenic in Situ Hybridization: A Practical Alternative for fluorescence in Situ Hybridization to Detect HER-2/neu Oncogene Amplification in Archival Breast Cancer Samples.
Am J Pathol 157, 1467 – 1472.
56. Wittekind, C., Bertolini, J. (2010):
TNM-System 2010.
Der Onkologe 16, 175 – 180.
57. Wolff, A., Hammond, M., Schwartz, J., Hagerty, K., Allred, D., Cote, R., Dowsett M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Langer, A., McShane, L., Paik, S., Pegram, M., Perez, E., Press, M., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S., Tubbs, R., Vance, G., van de Vijver, M., Wheeler, T., Hayes, D., American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists (2007):
American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.
J Clin Oncol 25, 118 – 145.
58. Xu, J., Han, Y., Duan, H., Gao, E., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, J., Toschi, L., Galetta, D., Azzariti, A., Paradiso, A. (2009):
EGFR mutations and HER2/3 protein expression and clinical outcome in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib.
J Cancer Res Clin Oncol 135, 771 – 782.
59. Yang, Q., Guan, K. (2007):
Expanding mTOR signaling
CELL RES 17, 666 – 681.
60. Yano, T., Doi, T., Ohtus, A., Boku, N., Hashizume, K., Nakanishi, M., Ochiai, A. (2006):
Comparison of HER” gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer.
Oncol Rep 15, 65 – 71.
61. Yoon, Y., Kim, H., Han, S., Oh, D., Im, S., Bang, Y., Kim, T. (2010):
KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: Implication for combinatorial approach
Mol Carcinog 49, 353 – 362.

62. Yoshida, Y., Murayama, T., Sato, Y., Suzuki, Y., Saito, H., Nomura, Y. (2016):
Gender Differences in Long-Term Survival after Surgery for Non-Small Cell Lung
Cancer.
Thorac Cardiovasc Surg 64, 507 – 514.
63. Zhao X, Zhu G, Chen H, Yang P, Li F, Du N. (2014):
Efficacy of icotinib versus traditional chemotherapy as first-line treatment for prevent-
ing brain metastasis from advanced lung adenocarcinoma in patients with epidermal
growth factor receptor-sensitive mutation.
J Cancer Res Ther 10, 155 – 159.
64. Zhu, C., da Cunha Santos, G., Ding, K., Sakurada, A., Cutz, J., Liu, N., Zhang, T.,
Marrano, P., Whitehead, M., Squire, J., Kamel-Reid, S., Seymour, L., Shepherd, F.,
Tsao, M., National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21.
(2008):
Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer
Institute of Canada Clinical Trials Groupe Study BR.21.
J Clin Oncol 26, 4268 – 4275.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Stadium des NSCLC (Wittekind und Bertolini 2010)	8
Tabelle 2: N-Stadium des NSCLC (Wittekind und Bertolini 2010)	8
Tabelle 3: M-Stadium des NSCLC (Wittekind und Bertolini 2010)	9
Tabelle 4: Stadieneinteilung des NSCLC (Wittekind und Bertolini 2010)	9
Tabelle 5: Korrelationsanalysen	29

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesamtüberleben ST. III und ST. IV	23
Abbildung 2: Time to Treatment Failure (TTF) ST. III und ST. IV	23
Abbildung 3: Diagramm des Untersuchungs-Algorithmus auf HER2-Expression, Amplifikations- und Mutationsstatus	24
Abbildung 4: Verteilungshistogramm der Medianwerte des pAKT-Scores	26
Abbildung 5: Verteilungshistogramm der Medianwerte des pERK-Scores	27
Abbildung 6: Korrelation des pAKT-Scores mit dem HER2-DAKO-Score	28
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens bei pAKT-positivem als auch pAKT-negativem Tumor im Gesamtkollektiv	30
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei pERK-positivem als auch bei pERK-negativem Tumor im Gesamtkollektiv	30
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei HER2-positivem als auch bei HER2-negativem Tumor im Stadium IV	32
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei pAKT-positivem als auch bei pAKT-negativem Tumor im Stadium IV	33
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve der time to Treatment Failure bei pAKT-positivem als auch bei pAKT-negativem Tumor im Stadium IV	33
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens bei pERK-positivem als auch bei pERK-negativem Tumor im Stadium IV	34
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve der time to Treatment Failure bei pERK-positivem als auch bei pERK-negativem Tumor im Stadium IV	34

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B (PKB)
ALK	anaplastic lymphoma kinase
CISH	Chromogene-in-situ-Hybridisierung
DNA	deoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor (ERBB1)
EML	echinoderm microtubule-associated protein like proteins
ERBB	erythroblastosis homologue B
ERK	extracellular signal-related kinase
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Agency
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HER2	human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2)
IHC	Immunhistochemie
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma
OS	overall survival (Gesamtüberleben)
pAKT	Phosphorylierte AKT
PDK1	phosphoinositide-dependent Kinase-1
pERK	phosphorylated ERK
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
ROS1	proto-oncogene tyrosine-protein kinase 1
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCLC	small-cell lung cancer
SOS	son of sevenless
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase 1
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TTF-1	time to treatment failure 1 (Zeit bis zum Versagen der Ersttherapie)
TSC	tuberous sclerosis complex 1/2
UICC	Union international contre le cancer

7.4 Danksagung

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Betreuer, Dr. med. Marcel Wiesweg, bedanken dafür, dass ich zu seiner Forschungsarbeit beitragen durfte und er mir immer unterstützend zur Seite stand.

Mein Dank gilt auch Priv.-Doz. Dr.med. Henning Reis und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Essen, die an der Analyse der Patientenproben beteiligt waren.

Außerdem möchte ich recht herzlich meinem Doktorvater, Univ. Prof. Dr. med. Martin Schuler, danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Forschungsarbeit anzufertigen.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.